



ESPAÑA

19 ES	11 21	NUMERO 448.024	10 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
6477/75	20.5.75	Suiza
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	
54 TITULO DE LA INVENCION		
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE ANTIBIOTICO LISOLIPINA.		
71 SOLICITANTE (S)		
CIBA-GEIGY AG.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Basilea, Suiza.		
72 INVENTOR (ES)		
Prof. Dr. Hans Zähler, Dr. Hannelore Drautz, Prof. Dr. Walter Keller.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
GOMEZ--ACEBO.		

La invención se refiere al nuevo antibiótico lisolipina hidróinsoluble, que se presenta en forma de sus componentes X e I, ó de mezclas de estos componentes, a los derivados del antibiótico así como a los preparados, que contienen estos compuestos y a procedimientos para la obtención de estas sustancias.

El antibiótico lisolipina se forma en el cultivo de la cepa *Streptomyces violaceoniger* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici Tú 96, que se guarda bajo esta denominación en el instituto para microbiología de la Universidad Tübingen (República Federal Alemana). La cepa está depositada bajo la denominación NRRL 8097 en Northern Regional Lab., Us.-Department of Agriculture, Peoria, Illinois.

La cepa *S. violaceoniger* Tú 96 forma además otro antibiótico, la ropalocidina, que se describen en la disertación de Dietmar Mahl "Ropalicidin ein antifungisches Antibiotikum aus *Streptomyces violaceoniger*" (la ropalocidina, un antibiótico antifúngico de *Streptomyces violaceoniger*), Stuttgart, 1971.

La cepa *S. violaceoniger* Tú 96 forma inicialmente un micelo de aire blanco, más tarde gris ceniza. Las cadenas de esporas están monopodialmente ramificadas y tienen la forma de hélices, estrechas, regulares, que raramente comprenden más de tres espiras. Las esporas son elipsoides, aproximadamente 0,9 nm de ancho y 1,2 nm de largo y tienen una superficie lisa. Durante el crecimiento sobre caldo de cultivo peptónico (peptona-agar de hierro) no se observa tampoco después de varios días de incubación ningún descoloramiento melanoide. La cepa no presenta, por lo tanto, cromogenidad, ya que no es capaz de formar tirosinasa.

El antibiótico lisolipina se obtiene cultivando aeróbicamente la cepa *S. violaceoniger* Tü 96 o una mutante formadora de lisolipina de esta cepa en un caldo de cultivo acuoso conteniendo una fuente de carbono y de nitrógeno así como sales inorgánicas hasta que el caldo de cultivo presente un efecto esencialmente antibiótico y después de lo cual se aísla el antibiótico lisolipina del filtrado de cultivo. Mutantes formadoras del antibiótico se pueden obtener, por ejemplo, bajo los efectos de rayos ultravioletas o rayos X o de nitrógeno-aceites de mestaza.

Como fuente de carbono son de mencionar, por ejemplo; carbohidratos asimilables, por ejemplo, glucosas, sacarosa, lactosa, manita, fécula, glicerina. Como nutrientes nitrogenosos sean mencionados: aminoácidos, péptidos y proteínas así como sus productos de disociación tales como peptona o triptona, además extractos de carne, las partes hidrosolubles de granos de cereales, tales como maíz y trigo, de residuos de destilación de la obtención de alcohol, de levadura, judías, especialmente de la planta de soja, de semillas, por ejemplo, de la planta de algodón, etc., pero también sales amónicas y nitratos. De otras sales inorgánicas el caldo de cultivo puede contener, por ejemplo, cloruros, carbonatos, sulfatos, fosfatos de metales alcalinos o alcalinotérreos, de magnesio, hierro, zinc y manganeso.

El cultivo se efectúa aeróbicamente, esto es, por ejemplo, en cultivo superficial en reposo o preferentemente submerso bajo agitación con aire u oxígeno en matraces agitados o en fermentadores conocidos. Como temperatura es adecuada una entre 18 y 40°C, preferentemente 27°C. Un efecto antibiótico esencial le presenta el caldo de cultivo aquí, por lo general después de 3 a 7 días. Preferentemente se cultiva

en varias etapas, es decir, primeramente se preparan uno o varios cultivos previos en medio nutriente líquido, que entonces se inyectan en el medio de producción propiamente dicho, por ejemplo, en una proporción de 1:20, El cultivo previo se obtiene, por ejemplo, inyectando un micelo esporificado obtenido después de un crecimiento de unos 14 días en un caldo de cultivo a un medio líquido y dejando crecer durante 72 horas.

El antibiótico está contenido en el filtrado de cultivo. El aislamiento del antibiótico del filtrado de cultivo se efectúa según métodos en sí conocidos teniendo en consideración las propiedades químicas, físicas y biológicas, especialmente las propiedades lipofilas del antibiótico. Para comprobar el efecto antibiótico, (es decir, la existencia del antibiótico), es especialmente adecuado el *Bacillus subtilis* como organismo de ensayo.

Del filtrado del cultivo se puede extraer el antibiótico con un disolvente lipofilo no miscible con agua, por ejemplo, con éster acético, hidrocarburos, tales como ciclohexano, benceno, o con hidrocarburos halogenados, por ejemplo, cloruro metilénico, cloroformo, tetraclorocarbono, tetracloroetileno.

Para la purificación del producto en bruto obtenido después de evaporar el disolvente se puede emplear, por ejemplo, la extracción, la precipitación, la distribución entre fases disolvente no miscibles o la absorción, ante todo la cromatografía. Una gran parte de las sustancias acompañantes más lipófilas se pueden retirar por extracción del producto en bruto con éter de petróleo. El producto en bruto también se puede disolver, por ejemplo, en metanol y separar

mediante agentes de absorción, tales como carbón activo, gel de sílice, silicato de magnesio, óxido de aluminio o mezclas de los mismos o resinas de absorción, por ejemplo, dextranos, tales como "Sephadex" (de la firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) de las sustancias acompañantes. Por ejemplo, el producto en bruto se puede purificar mediante repetida cromatografía en columna bajo empleo de gel de sílice, convenientemente con reducidos aditivos de carbón activo. El antibiótico se eluye preferentemente según el procedimiento de gradiente con mezclas de cloroformo o tetraclorocarbono y metanol, aumentándose gradualmente el porcentaje del contenido del disolvente más fuertemente polar.

La distribución arriba mencionada entre fases disolvente no miscibles se pueden efectuar también como distribución en contracorriente en un aparato según Craig. Como sistema disolvente se emplea, por ejemplo, una mezcla de cloroformo, ciclohexano, metanol y agua.

Para la obtención de los distintos componentes unitarios del antibiótico se puede efectuar su separación y aislamiento, por ejemplo, según el método de la cromatografía preparativa de capa delgada bajo las condiciones descritas para la demostración analítica. Más ventajosa es la separación mediante cromatografía de columna, empleándose como agente de absorción, por ejemplo, gel de sílice con un contenido de un 1 - 5 % de carbón activo y efectuándose la elución preferentemente según el procedimiento de gradiente con una mezcla de cloroformo y metanol. El aumento de la concentración del disolvente menos polar se efectúa convenientemente en pequeñas graduaciones porcentuales, por

ejemplo, 5-20 % de cloroformo, o se trabaja según el método continuo de elución en gradiente. En caso dado, se puede repetir el proceso de purificación.

En el cromatograma de capa delgada sobre placas de gel de sílice de la firma Merck (Kieselgel 60, F254) muestran los componentes los siguientes valores Rf: en cloroformo-metanol (9:1): X = 0,58; I = 0,81; en benceno-metanol (9:1): X=0,26; I = 0,30; en cloroformo-acetona (5:5): X = 0,40; I = 0,53; en benceno-acetona (5:5): X = 0,47; I = 0,74. Para la lisolipina I se hallaron en el ensayo de dilución en serie las siguientes concentraciones de inhibición mínimas (MIC):

Microorganismos	MIC en $\gamma$ /cc Lisolipina I	
15 <u>Eubacteriales (gram-negativas)</u>		
Achromobacter geminiani (27°)	>0,0025	<0,005
Salmonella minnesota (37°)	>0,5	<1
Salmonella typhimurium (37°)	>100	
Proteus vulgaris (37°)	>0,001	<0,0025
20 <u>Eubacteriales (gram-positivas)</u>		
Arthrobacter aurescens (27°)	>0,001	<0,0025
Arthrobacter crystallopoietes (27°)	>0,001	<0,0025
Arthrobacter simplex (27°)	>0,001	<0,0025
Bacillus brevis (37°)	>0,025	<0,05
25 Bacillus megaterium (37°)	>0,001	<0,0025
Bacillus subtilis (37°)	>0,001	<0,0025
Brevibacterium flavum (27°)	>0,001	<0,0025
Clostridium pasteurianum (30°)	>0,001	<0,0025

	Chromobacterium violaceum (27°)	>0,1	<0,5
	Corynebacterium poinsettiae (27°)	>0,001	<0,0025
	Corynebacterium rathayi (27°)	>0,001	<0,0025
	Micrococcus luteus (27°)	>0,001	<0,0025
5	Micrococcus roseus (27°)	>0,001	<0,0025
	Sarcina lutea (27°)	>0,001	<0,0025
	Staphylococcus aureus (37°)	>0,001	<0,0025
	<u>Pseudomonadales</u>		
	Pseudomonas fluorescens (27°)	>0,001	<0,0025
10	Pseudomonas saccharophila (27°)	>0,001	<0,0025

Para la lisolipina X se encuentra el MIC en un factor de 10-50 superior.

El componente I de la lisolipina muestra las siguientes propiedades químicas y físicas:

15 Es una sustancia cristalina intensamente amarilla, que es prácticamente insoluble en agua y ácidos acuosos y bases; es parcialmente soluble en alcanoles inferiores tales como metanol, etanol, n-propanol, así como en éteres y éter de petróleo. Como más arriba se ha mencionado, se disuelve bien en acetona, dimetilformamida, sulfóxido dimetílico, éster acético, hidrocarburos, por ejemplo, ciclohexano, benceno, e hidrocarburos halogenados.

20

La lisolipina I, cristalizada en acetona-éter, funde a 260-262° bajo descomposición.  $[\alpha]_D^{20} = -50,2^\circ$  (cloroformo). En la cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice en el sistema cloroformo-metanol (19:1) el Rf es 0,6.

25

El análisis elemental da los siguientes valores:

$C_{29}H_{24}ClNO_{11}$  (597,95):

Calculado:	C 58,25	H 4,05	Cl 5,93	N 2,34	3 OCH <sub>3</sub>	15,57 %
Encontrado:	C 58,36	H 4,22	Cl 6,03	N 2,48	OCH <sub>3</sub>	15,43 %
	C 58,30	H 4,27		N 2,38		

5 (OCH<sub>3</sub> : determinación según Zeisel).

Peso molecular por osmometría de presión de vapor en acetato etílico: encontrado 536.

Microtitración en hidróxido tetrametilamónico 0,1-n en metilcelosolve-agua (8:2): encontrado  $pK^*_{MCS}$  9,72, Aeq.-G. 545

10 Titración con HCl 0,1-n: ningún escalón (el átomo de nitrógeno, por lo tanto, no es básico).

La Figura 1 muestra el espectro infrarrojo de lisolipina I en KBr, la Figura 2 el espectro ultravioleta en etanol (al 96 %). La Figura 3 muestra el espectro RMN en CDCl<sub>3</sub> (100 MHz); por intercambio con D<sub>2</sub>O desaparecen sólo las dos señales en la zona Offset así como la señal ancha en unos 2,7 ppm. La Figura 4 muestra el espectro <sup>13</sup>C-RMN en CDCl<sub>3</sub> y poco sulfóxido dimetílico con desacoplamiento total del zumbido, la Figura 5 el espectro <sup>13</sup>C-RMN "Off-Resonance". La tabla 1 representa un resumen de las máximas de la Figura 4. La tabla 2 presenta el espectro de masas de lisolipina I.

20 Con respecto al espectro RMN (Figura 3) se han de aplicar los siguientes complementos:

25 1.) Desacoplamiento

Radiación a 4,43: el dubletten 5,02 ppm se vuelve un singlett. Irradiación a 5,02 ppm: los dubletts en 4,43 y 4,68 ppm se vuelven simultáneamente singletts.

La señal en 5,02 ppm corresponde en el integral

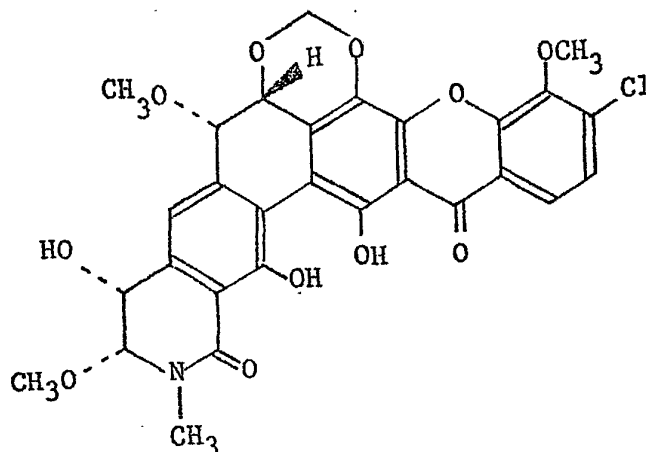
a 2 protones y se puede considerar como una superposición de un dublett y de un multiplett ancho. El dublett está en efecto alterno con el de 4,43 ppm, el multiplett con respecto al dublett en 4,68 ppm.

- 5 2.) Las constantes de copulación exactas se midieron en un espectro cuatro veces ampliado y dieron:  
4,43 (d): 3,0 Hz., 4,68 (d): 4,1 Hz., 5,02 (d): 3,0 Hz.,  
5,40 (d): 5,7 Hz., 5,62 (d): 5,7 Hz. Las dos últimas señales  
forman juntas un espectro AB, así como los dos dubletts  
10 en 7,36 y 7,90 ppm ( $J_{AB} = 8$  Hz., átomos de hidrógeno en posición o en un anillo aromático).

La lisolipina I muestra como mínimo dos grupos hidroxilo acilables. Mediante una acetilación larga (dos  
semanas a temperatura ambiente) se obtiene la di-O-acetil-  
15 lisolipina I, que se cristalizó en acetona-agua; prismas de cristal amarillo pálido del p.f. 216-224°. La Figura 6 muestra el espectro RMN en  $CDCl_3$  (100 MHz). La muestra de sustancia empleada contenía aún acetato de etilo. Esto  
origina las siguientes señales: el triplett en 1,2 ppm;  
20 un cuartett parcialmente superpuesto por señales de  $OCH_3$  en aproximadamente 3,5 ppm y una parte de la señal en aproximadamente 2,35 ppm. La tabla 3 representa el espectro de masas de la di-O-acetil-lisolipina I.

Cuando la acilación se efectúa sólo como es usual  
25 durante la noche se obtiene una mezcla de dos productos, que no se pudieron separar por cristalización, evidentemente un mono- y el diacetato. En el espectro de masas de esta mezcla aparecieron las señales en 683 y 681 unidades de masa ( $M^+$  del diacetato) con una intensidad considerable-  
30 mente inferior.

Mediante espectrometría de rayos X se determinaron para el componente I de la lisolipina la siguiente fórmula estructural:



5 La lisolipina X se obtuvo como polvo amorfo incoloro. Esta forma lisolipina I al calentar o al irradiar con luz ultravioleta. Es muy inestable; al almacenar bajo aire, especialmente a temperatura ambiente o temperatura más elevada, se transforma lentamente en lisolipina I.

10 Una separación parcial de lisolipina X e I se pudo lograr por distribución según Craig en el sistema tetraclorocarbano-cloroformo-metanol-agua (3,42:2,28:4:1). El polvo amorfo, casi incoloro, así obtenido, la lisolipina X, no se pudo cristalizar. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice en el sistema cloroformo-metanol (39:1) el

15 R<sub>f</sub> es de 0,22 (el R<sub>f</sub> de lisolipina I es 0,39). La Figura 7 muestra el espectro RMN de lisolipina X en CDCl<sub>3</sub> (100 MHz). Las señales en 0,9 y 1,3 ppm se deben posiblemente a una impureza grasosa. La mayoría de las señales en la zona de

20 3 a 8 ppm son, sin embargo, muy similares a las de la lisolipina I y demuestran parentesco cercano de los dos compuestos. La Figura 8 muestra el espectro ultravioleta de lisoli-

pina X en cloroformo.

La lisolipina y sus derivados presentan, además de su efecto antibacterial contra bacterias, también un reducido efecto con respecto a los hongos similares a la levadura, tales como *Candida albicans*, *Candida lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae*. Es eficaz tanto contra las células microbiales crecientes y en reposo como también contra sus esferoplastos. Su eficacia se basa probablemente en una inhibición de la síntesis de las paredes de las células.

El efecto es parcialmente eliminado por un exceso en lípidos, por ejemplo, esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos de la pared de las células de bacterias.

La lisolipina y sus derivados se pueden emplear solas o en combinación con otros antibióticos inhibidores de la síntesis de las paredes de células, tales como penicilinas, cefalosporinas, cicloserina, para combatir infecciones provocadas por bacterias así como agentes de desinfección. Con algunos antibióticos, por ejemplo, con penicilinas, se observó un efecto sinérgico.

Para la obtención de preparados farmacéuticos se puede mezclar el antibiótico con un excipiente inorgánico u orgánico adecuado para aplicación topical, enteral o parenteral. Como tales entran en consideración aquellas sustancias que no reaccionan con el nuevo compuesto, tales como, por ejemplo, gelatina, lactosa, fécula, estearato de magnesio, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, u otros excipientes medicinales. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar, por ejemplo, como tabletas, grageas, polvos, supositorios, o en forma líquida como soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas o ungüentos. En caso dado, estarán

esterilizados y/o contendrán adyuvantes tales como agentes de conservación, de estabilización, de humectación o emulsión. Asimismo pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. También los agentes de desinfección se pueden mezclar con sustancias excipientes adecuadas conocidas.

La invención se describe en los ejemplos siguientes. Las temperaturas se indican en grados centígrados.

Las Figuras representan:

- Fig. 1 : Espectro infrarrojo de lisolipina I en KBr.
- 10 Fig. 2 : Espectro ultravioleta de lisolipina I en alcohol fino.
- Fig. 3 : Espectro RMN de lisolipina I en  $\text{CDCl}_3$ .
- Fig. 4 : Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de lisolipina I con desacoplamiento total de zumbido.
- 15 Fig. 5 : Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de lisolipina I, off-resonance.
- Fig. 6 : Espectro RMN de di-O-acetil-lisolipina I.
- Fig. 7 : Espectro RMN de lisolipina X, no totalmente pura.
- Fig. 8 : Espectro ultravioleta de lisolipina X en  $\text{CHCl}_3$ .

Las tablas representan:

- 20 Tabla 1 : Espectro de masas de lisolipina I.
- Tabla 2 : Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN de lisolipina I.
- Tabla 3 : Espectro de masas de di-O-acetil-lisolipina I.

#### Ejemplo 1

25 Una lioampolla con 5 cc de suspensión de esporas de *S. violaceoniger* Tü 96 se suspende con 5 cc de tampón de fosfato 0,2-m del pH 7. 3 matraces de Erlenmeyer con 1 baffle conteniendo cada uno 100 cc de caldo de cultivo, que por litro de agua de la red contiene 4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta y 4 g de glucosa, y cuyo

pH se ajustó antes de la esterilización con lejía sódica 1-n a 7,3, se inyectan en cada caso con 2 cc de la suspensión de Streptomyces y se incuba durante 24 horas en una máquina vibradora en rotación con 250 rpm a 27°. Cada vez, 25 cc del cultivo así obtenido se inyectan en seis matraces de Erlenmeyer de 2 litros de capacidad con 4 baffles y 500 cc de la solución de cultivo de arriba. Los matraces se incuban a continuación a 27° en una máquina vibradora en rotación a 120 rpm durante 48 horas.

0,75 litros del cultivo del matraz de 2 litros se trasladan a un fermentador de 50 litros de capacidad, que contiene 30 litros del caldo de cultivo de arriba y se incuba durante 24 horas a 27°. Después se trasladan 15 litros del cultivo a un fermentador con 300 litros del caldo de cultivo de arriba. Este fermentador presenta un volumen total de 500 litros y posee un agitador de turbina de 6 hojas y 4 baffles. Las condiciones de cultivo en el fermentador son: presión 0,5 atmósferas, velocidad de agitación 450 rpm, temperatura 27°C, paso de aire 1 litro V/Vmin. Las condiciones corresponden a una proporción de absorción de oxígeno medido en solución de sulfito de 150 mM  $O_2$ /l/h. La formación óptima del antibiótico lisolipina se presenta después de unas 100 horas de incubación. El caldo de cultivo presenta entonces un pH de 7,5. En el ensayo de difusión de agar con Bacillus subtilis en un halo inhibitorio de 14-15 mm empleando Whatmann A rondales de filtro con un diámetro de 6 mm.

### Ejemplo 2

600 litros de la solución de cultivo obtenida según el ejemplo 1 se filtran bajo adición de un 2 % de auxi-

5  
10  
10

liar de filtración "Dicalite" (tierra de diatomeas). 560 litros de filtrado de cultivo se ajustan con lejía sódica a un pH de 9,0 y en un extractor continuo se extrae dos veces con cloroformo en proporción 2:1. El refinado acuoso inactivo se desecha. 600 litros de fase clorofórmica se concentran en vacío. Se obtienen 290 g de residuo seco. Este se digiere con 2 litros de éter de petróleo. El extracto de éter de petróleo inactivo se desecha y la parte insoluble se seca en vacío. Queda un residuo semisólido, marrón amarillo (46 g).

Ejemplo 3

15  
20

2,8 g del producto en bruto obtenido según el ejemplo 2 se cromatografían en una columna de Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (dextrano reticulado alquilado), longitud 73 cm, diámetro 3 cm, con cloroformo-metanol (1:1) con una velocidad de 20 cc por hora. Se recogen, cada vez, fracciones de 5 cc. El contenido relativo en lisolipina I de las fracciones se determina fotométricamente en 360 nm; el contenido en lisolipina I determinado en las fracciones 40 - 47 se supone arbitrariamente como 1. Se obtiene la siguiente distribución:

Fracción	mg de residuo seco	Contenido relativo en lisolipina I
1 - 27	40	menos de 0,05
25 28 - 29	30	0,46
30 - 39	524	0,58
40 - 47	618	1
48 - 55	234	0,29
56 - 80	233	menos de 0,1

Las fracciones 40 - 47 dan de acetona-éter 416 mg de cristales amarillo intenso de lisolipina I, p.f. 260 - 262° (descomposición). Ulteriores propiedades químicas, físicas y biológicas se mencionan en la parte general de la descripción.

De las lejías madre de la cristalización y de las fracciones adyacentes se pueden obtener con nueva cromatografía en Sephadex® LH-20 otros 360 mg de cristales.

#### Ejemplo 4

300 mg de lisolipina I se dejan reposar con 10 cc de piridina y 10 cc de anhídrido de ácido acético durante 2 semanas a temperatura ambiente, después se evapora la solución en vacío. El residuo se cromatografía en 30 g de gel de sílice con cloroformo-éster acético (4:1). Los primeros 150 cc de eluado contienen 48 mg de material no unitario. Los siguientes 210 cc dan 220 mg de un material oleaginoso amarillo pálido, que en el cromatograma de capa delgada (gel de sílice, éster acético como eluyente; coloreamiento con vapor de iodo) presenta una mancha principal con Rf 0,33 y dos impurezas débiles. Mediante lenta cristalización en acetona-agua se forman prismas de cristal amarillo pálido con un punto de fusión inexacto 216-224°. Espectro RMN en CDCl<sub>3</sub> (100 MHz) véase Fig. 6. La muestra contiene aún algo de acetato de etilo (proveniente de la cromatografía) que se aprecia en el espectro RMN. En base del espectro de masas (véase tabla 3) está presente un diacetato.

Si la acetilación se efectúa sólo en la forma usual durante el transcurso de la noche se obtiene una mezcla de dos productos, que no se pudieron separar por cristalización, evidentemente un mono- y el diacetato. En el es-

pectro de masas de esta mezcla se presentan las señales en 683 y 681 unidades de masa ( $M^+$  del diacetato) con una intensidad considerablemente inferior.

#### Ejemplo 5

5                   1,5 g del producto en bruto obtenido según el ejemplo 2 se someten a una distribución según Craig a través de 190 escalones en el sistema de disolventes tetracloro-  
10                   carbono (3,42 litros)-cloroformo (2,28 litros)-metanol (4 litros)-agua (1 litro). Las fracciones 26 - 54 teñidas fuertemente amarillo contienen, ante todo, lisolipina I. Esta se aísla diluyendo las fracciones con el doble volumen de agua, separando la fase orgánica, agitando la fase acuosa tres veces con cloruro metilénico, reuniendo las fases orgánicas, secando con sulfato sódico y evaporando en vacío.  
15                   Se obtienen 258 mg de lisolipina I unitaria, según el cromatograma de capa delgada, que se puede seguir purificando por cromatografía en Sephadex<sup>®</sup> LH-20 y recristalización como arriba descrito.

20                   Las fracciones 76-100 dan en elaboración análoga un polvo amorfo casi incoloro (393 mg), la lisolipina X, que no se puede purificar por cristalización. Espectros RMN y ultravioleta véase Figura 7 y 8. En la cromatografía de capa delgada en gel de sílice en cloroformo-metanol (39:1) es  $R_f = 0,22$  (con respecto a 0,39 para lisolipina I).  
25                   En la placa de capa delgada se vuelve la mancha inicialmente muy pálida, casi no reconocible de lisolipina X, más intensamente amarilla al reposar bajo atmósfera, más rápidamente al calentar. Eluyendo la mancha y bajo nueva cromatografía de capa delgada se demuestra que la lisolipina X se ha  
30                   transformado en lisolipina I.

Una muestra de lisolipina X se cromatografía con metanol en Sephadex LH-20. Una zona amarilla pálida inicial se vuelve más intensamente amarilla según progresa la cromatografía. Las fracciones de eluado amarillas demuestran en el cromatograma de capa delgada ser idénticas a la lisolipina I.

Un preparado inicialmente casi incoloro de lisolipina X se mantiene durante varios meses en la nevera. Durante este tiempo adquiere un color intensamente amarillo. Mediante distribución según Craig (véase más arriba) se obtienen del preparado aún reducidas cantidades de lisolipina X. La cantidad principal se puede identificar como lisolipina I.

Tabla I

Lisolipina I.

<sup>13</sup>C-RMN <sup>13</sup>C-RMN (25,2 MHz). Disolvente: CDCl<sub>3</sub> + algo de DMSO

Nº.	δ (ppm)	m	Nº	δ (ppm)	m
	1. 181,26	s	15.	117,77	s
	2. 168,26	s	16.	116,15	d
20	3. 158,60	s	17.	111,24	s
	4. 151,26	s	18.	110,37	s
	5. 149,65	s	19.	108,54	s
	6. 144,95	s	20.	92,63	d
	7. 143,17	s	21.	90,95	t
25	8. 140,53	s	22.	78,87	d
	9. 138,86	s	23.	75,31	d
	10. 134,06	s	24.	67,70	d
	11. 133,09	s	25.	61,55	q OCH <sub>3</sub>
	12. 127,91	s	26.	58,42	q OCH <sub>3</sub>

Nº.	$\delta$ (ppm)	m	Nº	$\delta$ (ppm)	m
13.	125,48	d	27.	57,67	q OCH <sub>3</sub>
14.	120,62	?	28.	35,55	q

5  $\delta$  : Desplazamiento químico con respecto a tetrametilsilano como standard interno. m: Disociación en el espectro "off-resonance".

De los 29 átomos de carbono se reconocen 28 como señales independientes.

Tabla 2

10 Lisolipina I

Cristales amarillos, C<sub>29</sub>H<sub>24</sub>ClNO<sub>11</sub>

Espectro de masas. Di = 140°C.

	m/e	%	m/e	%	m/e	%
	601	0,2	524	0,3	475	0,25
15	600	1,0	523	0,2	474	0,20
	599	3,2	522	0,15	473	0,3
	598	2,7	521	0,3		
	597	8,0	520	0,35	471	0,1
	596	0,2	519	0,35	470	0,1
20			518	0,35	469	0,2
					468	0,6
	579 y				467	0,4
	581: huellas,		507	0,3	466	1,5
25	muy por debajo		506	0,7	465	0,2
	de un 0,1 %		505	0,7	464	0,4
			504	1,4		

	m/e	%	m/e	%	m/e	%
	570	0,3	503	0,2	463	0,3
	569	1,2	502	0,2	462	0,4
	568	1,3			461	0,25
5	567	4,0	497	0,2		
	566	1,0	496	0,6	450	0,1
	565	2,2	495	0,4	449	0,15
			494	1,2	448	0,2
	552	0,2	493	0,3	447	0,2
10	551	0,1	492	0,2	446	0,2
	550	0,15	491	0,15	445	0,3
	549	0,2	490	0,2		
			489	0,3	441	0,1
	539	0,7	488	0,3	440	0,4
15	538	2,5	487	0,2	439	0,3
	537	2,7	486	0,2	438	1,1
	536	6,5			437	0,1
	535	2,2	478	0,15	436	0,3
	534	0,3	477	0,2	435	0,2
20	533	0,4	476	0,25	434	0,25
	433	0,2	225	0,2	147	0,6
	432	0,1	224	0,2	146	0,25
	431	0,1	223	0,35	145	1,2
	430	0,1			144	0,3
25			219	0,2	143	0,7
	423	0,1	218	0,2	142	0,3
	422	0,2	217	0,5	141	0,6
	421	0,2	216	0,2	140	0,2
	420	0,4	215	0,35	139	0,35
30	419	0,2	214	0,1	138	0,3
	418	0,25	213	0,3	137	0,35

	m/e	%	m/e	%	m/e	%
	417	0,35	212	0,25	136	0,5
			211	0,3	135	1,2
	410	0,05	210	0,5	134	0,2
5	409	0,1			133	0,4
	408	0,2	191	0,2	132	0,6
	407	0,25	190	0,3	131	4,5
	406	0,3	189	0,6	130	0,5
	405	0,3	188	0,3	129	1,6
10	404	0,2	187	1,0	128	1,2
	403	0,1	186	0,2	127	0,6
	402	0,2	185	0,4	126	0,3
					125	0,4
	380	0,1	178	0,2	124	0,35
15	379	0,2	177	0,35	123	0,6
	378	0,3	176	1,0	122	0,5
	377	0,1	175	0,5	121	0,6
					120	0,4
	de 376-226		151	0,4	119	0,8
20	ninguna cresta		150	2,7	118	0,7
	que destaque del		149	3,5	117	3,9
	fondo, ninguna		148	0,8	116	0,8
	cresta superior					
	a 0,1 %					
	115	2,2	83	3,7	51	0,8
25	114	0,3	82	0,9	50	1,2
	113	0,4	81	1,5		
	112	0,5	80	0,3	46	0,3
	111	0,4	79	1,3	45	4,8
	110	0,9	78	0,7	44	3,3
30	109	0,7	77	1,9	43	← 45
	108	0,4	76	0,5	42	2,6
	107	1,0	75	0,6	41	6,1

	m/e	%	m/e	%	m/e	%
	106	0,7	74	6,3	40	0,5
	105	2,5	73	2,1	39	2,3
	104	0,4	72	0,3	38	0,6
5	103	0,8	71	1,7	37	0,3
	102	0,4	70	1,6	36	0,8
	101	0,5	69	3,5		
	100	0,2	68	0,9	33	2,3
	99	0,5	67	1,4	32	89
10	98	0,8	66	0,3	31	100
	97	1,5	65	0,9	30	15
	96	0,8	64	0,3	29	67
	95	1,6	63	0,4	28	5,7
	94	0,6	62	0,15	27	2,6
15	93	1,2	61	0,5	26	0,8
	92	0,6	60	1,8		
	91	3,4	59	4,8	19	0,7
	90	0,2	58	8,5	18	6,0
	89	0,5	57	3,2	17	1,5
20	88	0,2	56	1,5	16	0,3
	87	0,9	55	5,5	15	26
	86	0,2	54	0,5	14	2,2
	85	1,2	53	1,0		
	84	1,2	52	0,5		

Lectura en la 1ª pista:  
1% = 27 mm

Tabla 3

Di-O-acetil-lisolipina I

Espectro de masas. Di = 120°

	m/e	I (%)	m/e	I (%)	m/e	I (%)
5	685	2	577	7	507	3
	684	8	576	2	506	4
	683	24			505	6,2
	682	21	568	1	504	6,7
	681	58	567	1,3	503	3,3
10			566	2,5	502	1,6
	653	0,8	565	2		
	652	1,2	564	1,7	497	2,5
	651	3,0	563	0,9	496	9
	650	2,5	562	1,3	495	11
15	649	5,5			494	23
			551	1,2	493	16
	643	5	550	1,7	492	5,4
	642	20	549	4,0	491	3,7
	641	40	548	2,5	490	3,3
20	640	37	547	1,7	489	3,7
	639	100	546	3,7	488	6,3
					487	4
	612	5	537	2,5	486	6
	611	16	536	3,3		
25	610	17	535	6,7	479	1,2
	609	50	534	3,7	478	3,0
	608	15	526	3,7	477	3,3
	607	27	525	4,6	476	3,7
			524	10,2	475	4,0
30	600 Ión metaestab.	523	6,2	474	2,5	

	m/e	I (%)	m/e	I (%)	m/e	I (%)
	581	Ión metaestab.	522	1,7	473	2,0
			521	2,5	472	1,2
	581	5,5	520	4,6	471	1,7
5	580	15	519	5,4	470	1,7
	579	17	518	7,1	469	1,2
	578	40			468	3,3
	467	1,7	45	12		
	466	4,0	44	5		
10	465	3,7	43	48		
	464	5,1	42	13		
	463	6,0	41	7		
	462	10				
	461	8	32	33		
15	460	2,5	31	43		
			30	12		
			29	39		
		Desde 460 hasta	28	10		
		85 ninguna				
		cresta significativa				
20			18	8		
	85	3,3	17	2		
	84	2,0	16	1,2		
	83	4,4	15	15		
	82	1,7	14	5		
25	81	2,0				
	74	12				
	73	1,7				
	72	1,2				
	71	5,4				
30	70	3,0				

	m/e	I (%)	m/e	I (%)
	69	9,5		
	61	2,5		
	60	6,3		
5	57	7,5		
	56	2,5		
	55	5,4		

NOTA .-

10 Describa suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

15 1.- Procedimiento para la obtención del antibiótico lisolipina, en forma de sus componentes I y X, caracterizado porque la cepa Streptomyces violaceoniger Tü 96 o una mutante formadora de lisolipina se cultiva aeróbicamente en una solución nutriente acuosa, conteniendo una fuente de  
20 carbono y nitrógeno así como sales inorgánicas hasta que ésta presente un efecto antibiótico esencial y después de lo cual la lisolipina se aísla y, si se desea, se separa en sus componentes y/o se transforma en derivados.

25 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para comprobar la presencia del antibiótico se emplea Bacillus subtilis.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2,

caracterizado porque el filtrado de cultivo se extrae con un disolvente orgánico sólo poco miscible con agua.

5 4.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque el filtrado de cultivo se extrae con éster acético.

5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el antibiótico se purifica por extracción con éter de petróleo.

10 6.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el antibiótico se purifica por cromatografía.

15 7.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el antibiótico se purifica por cromatografía en resinas de absorción y/o se separa en sus componentes.

8.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el antibiótico se purifica por cromatografía en dextranos reticulados y/o se separa en sus componentes.

20 9.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el antibiótico se eluye con mezclas de cloroformo y metanol.

25 10.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se aísla el componente I del antibiótico lisoliprina.

11.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se aísla el componente X del antibiótico lisolipina.

30 12.- Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se aísla la liso

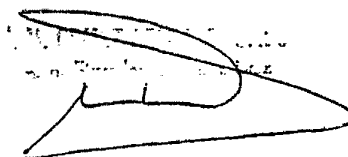
lipina I y se acetila a la di-O-acetil-lisolipina I.

13.- Procedimiento para la obtención de antibiótico lisolipina, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.

Esta Memoria consta de 26 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 15 JUN 1977

CIBA-GEIGY, A.G.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. G. ...', is written over a faint, rectangular stamp. The stamp contains some illegible text, possibly a date or reference number.

5

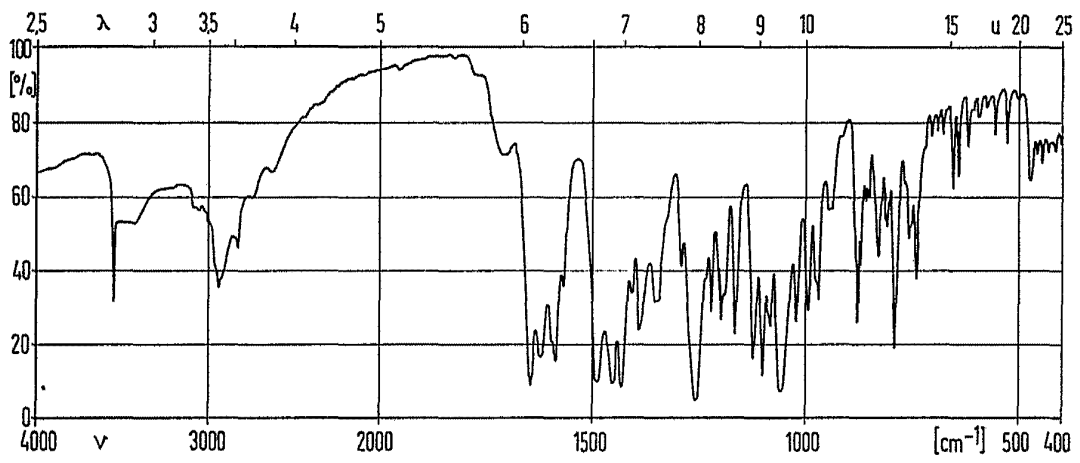


Fig. 1

Madrid 18 JUN. 1976

GÓMEZ ACEBS Y MUDET  
Firmador: L. Gastón Fernández

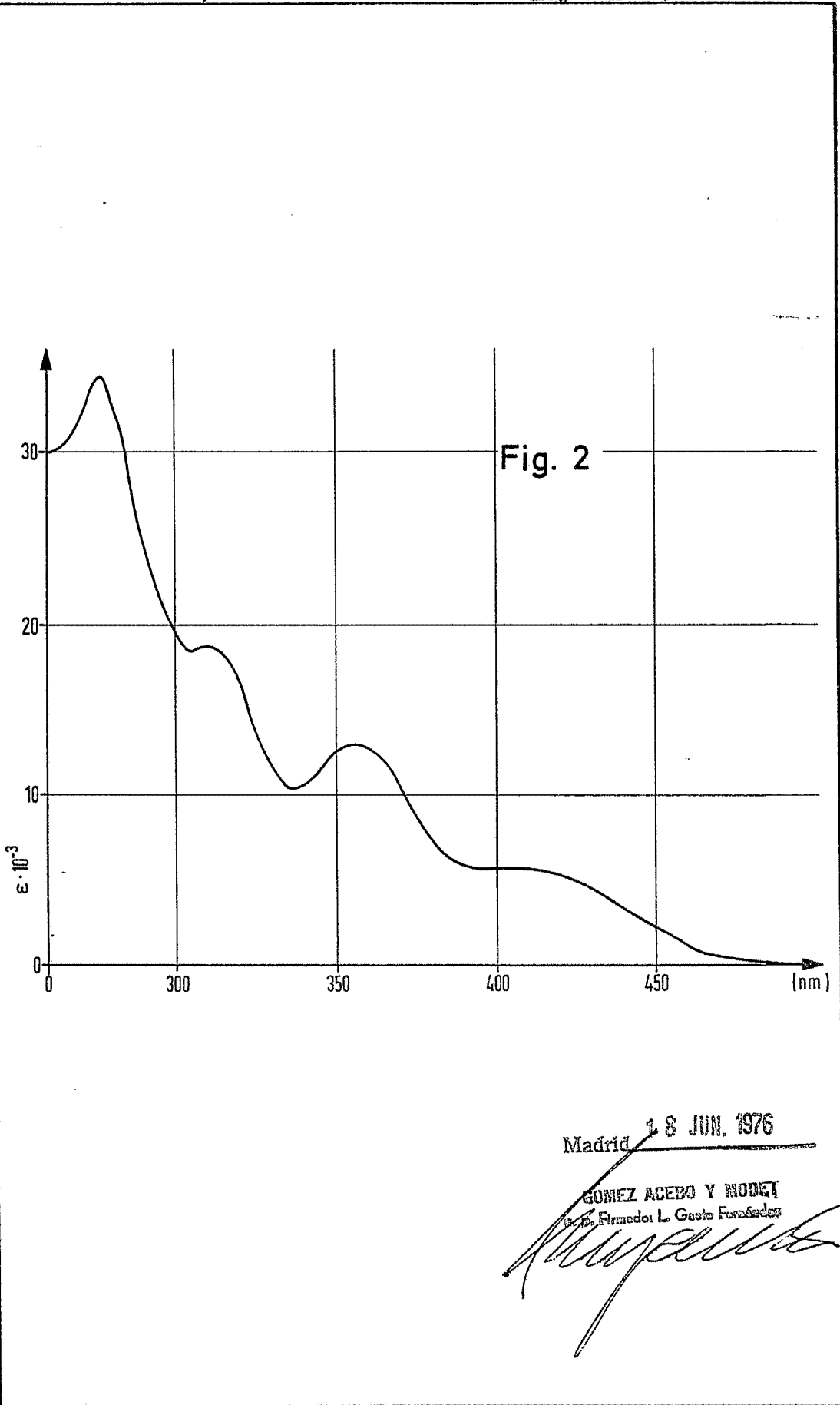
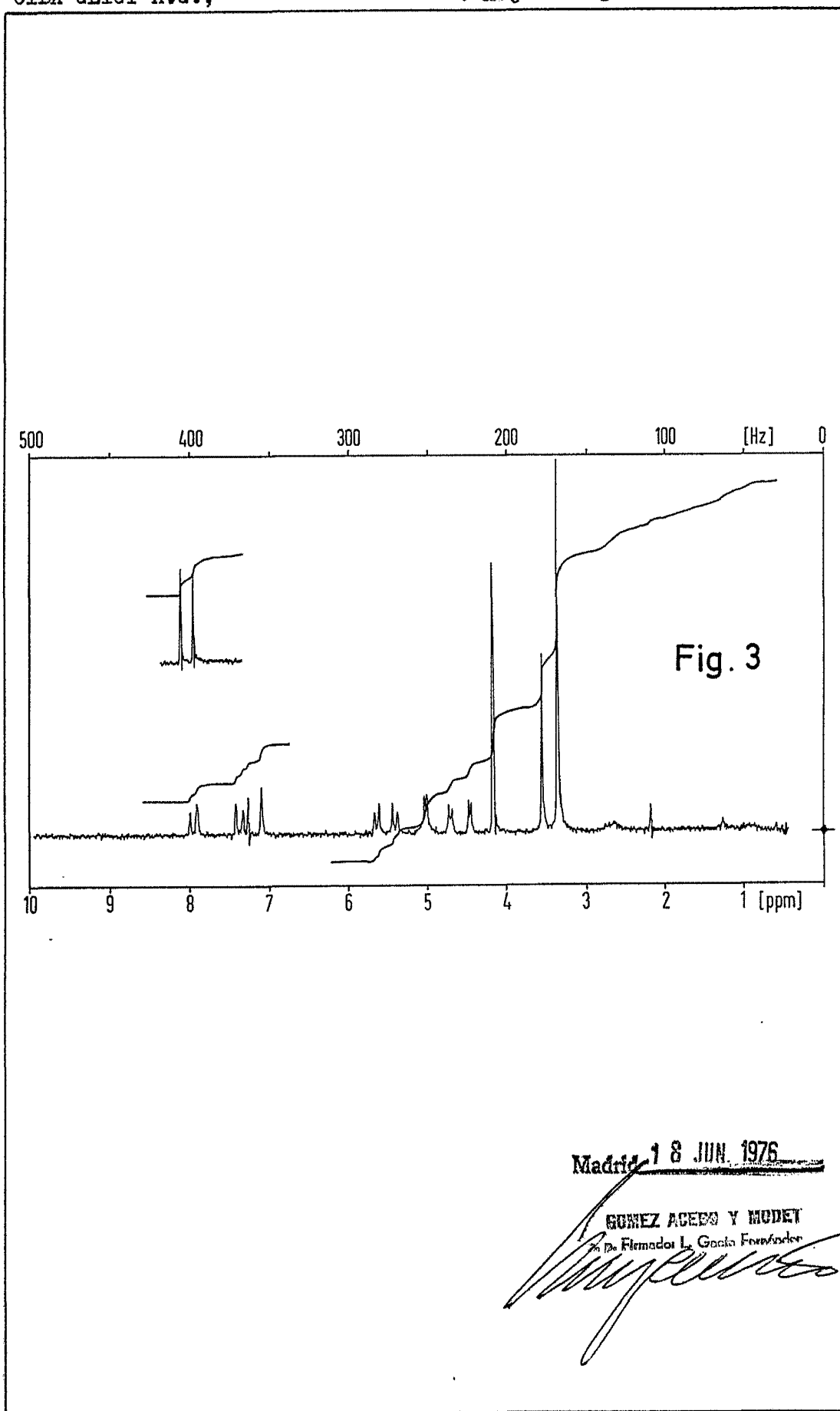


Fig. 2

Madrid 18 JUN. 1976

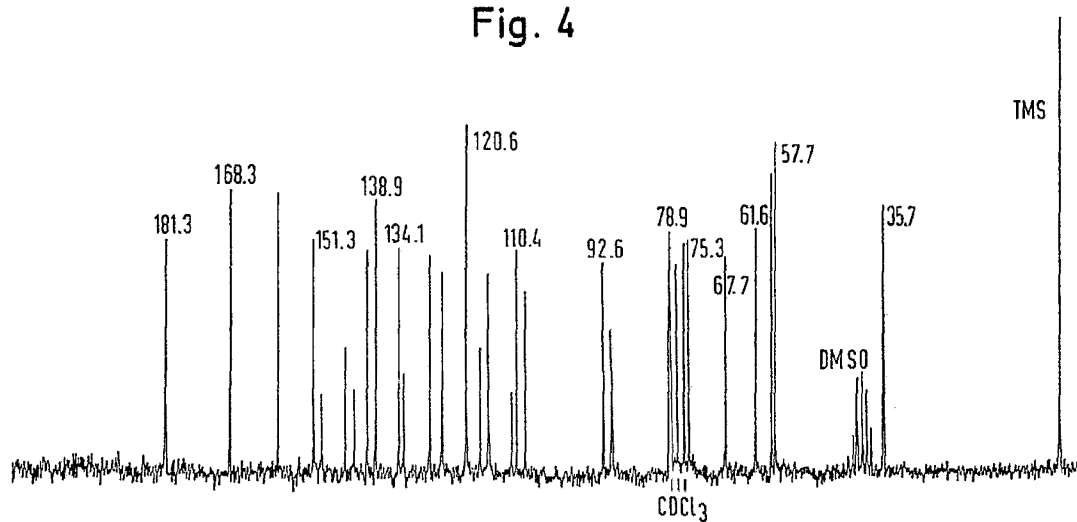
GOMEZ ACEBO Y NOBET  
S.A. Firmado: L. Costa Forcadell



Madrid 18 JUN. 1976

GONZALEZ ACEBO Y MUDET  
Ingenieros de Farmacia L. García Fernández

Fig. 4

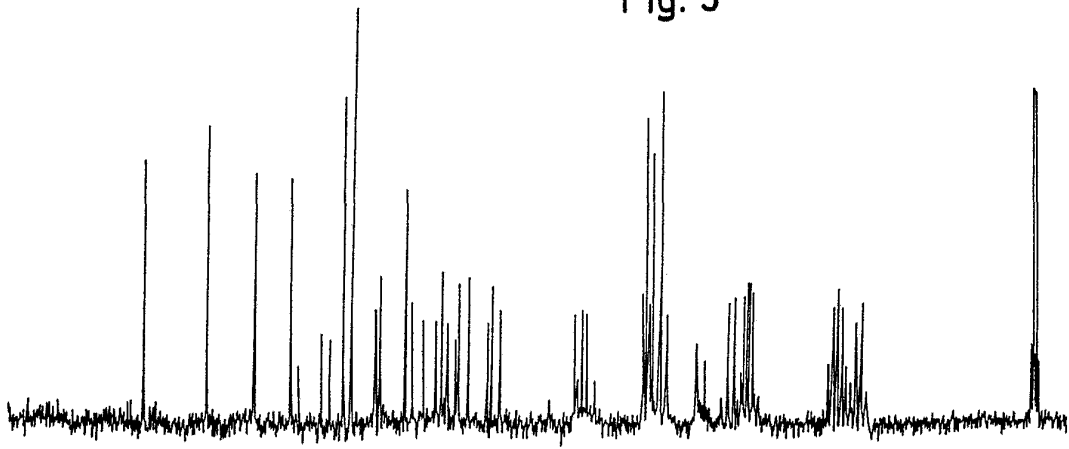


~~Madrid, 18 JUN 1976~~

GOMEZ ACEBO Y MODET

por p. Firmador: L. Guata Fernández

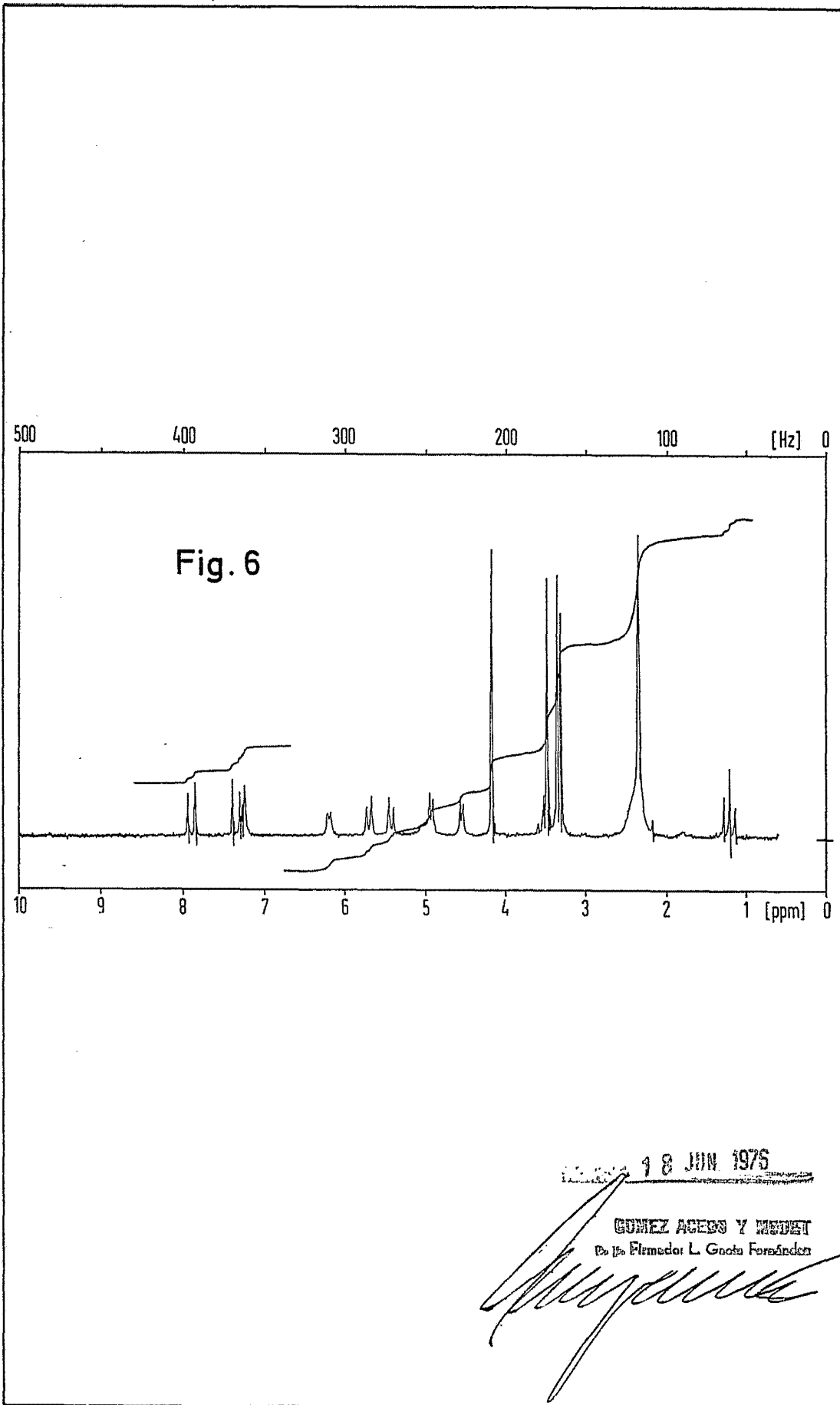
Fig. 5



18 JUN. 1976

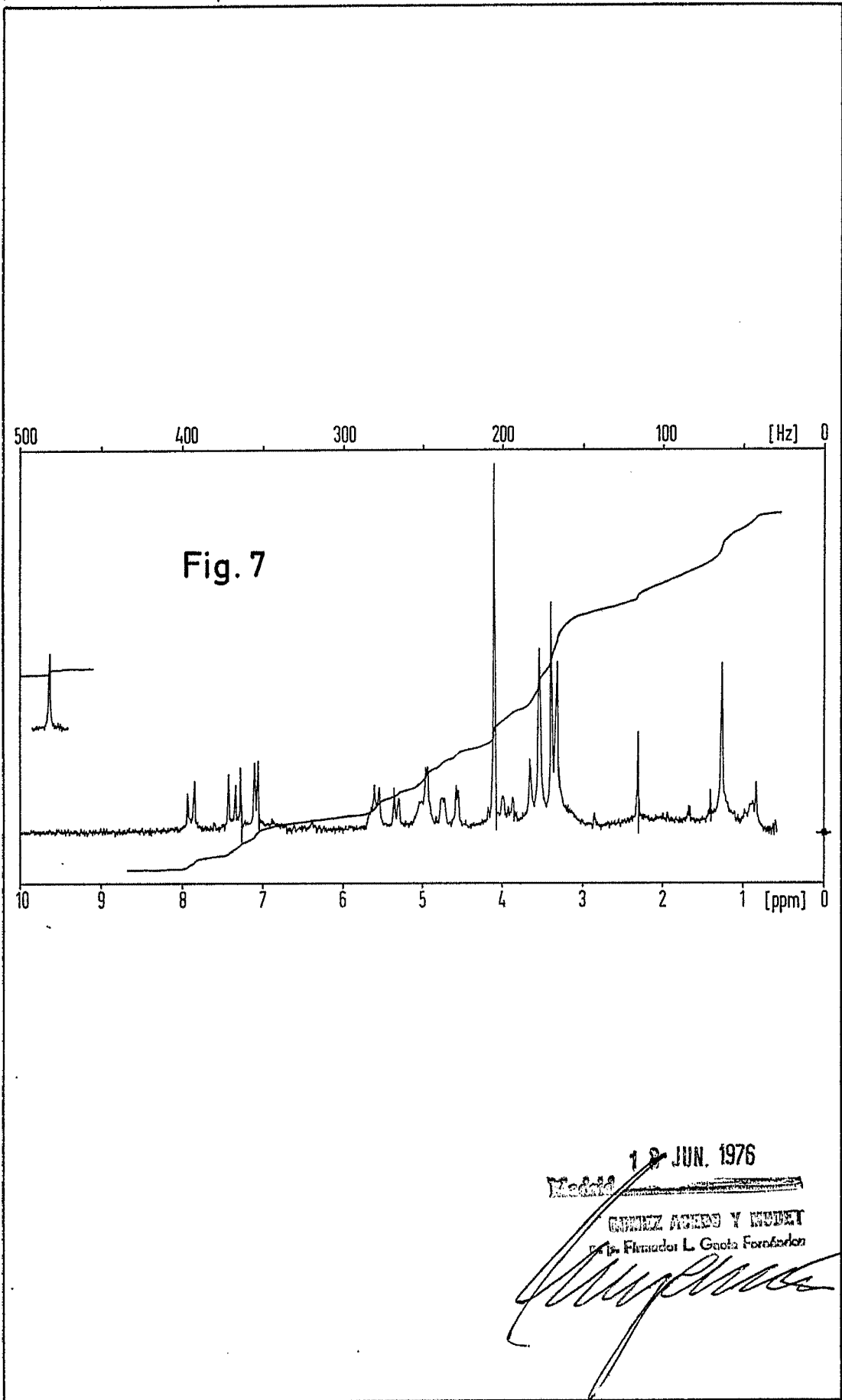
Madrid

GOMEZ ACEBO Y MUDET  
S.A. Firmador L. Gota Formados



18 JUN 1975

GOMEZ ACEBS Y MEDET  
Dr. J. Filmesdor L. Gracia Fernández



18 JUN. 1976

Madrid

GONZALEZ AGUIRRE Y MURDET  
E.I.P. Filiales L. Goeta Forobanden

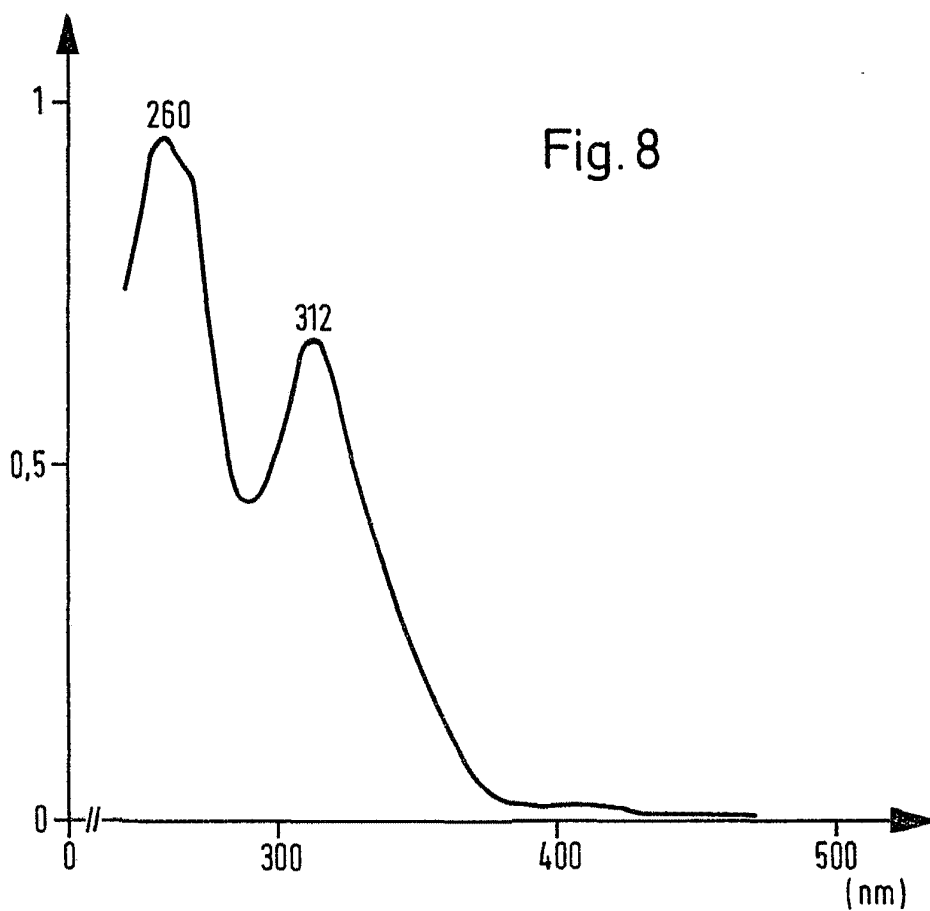


Fig. 8

Madrid 18 JUN 1976

GENEVA AVANCE Y MEDICINA  
Dr. Plácido L. Gachá Foculda