

309610

20 FEB 1965



MEMORIA DESCRIPTIVA

para

Una Patente de Invención  
por veinte años en España,

a favor de

THE UPJOHN COMPANY  
(sociedad de EE.UU.)

residente en

Kalamazoo, Michigan (EE.UU.)  
301, Henrietta Street

por:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE LINCOMICINA C"

- - - - -

INVENTORES: Alexander Demetrios Argoudelis, de nacionalidad griega, y Donald Joseph Mason, de nacionalidad norteamericana.

- - - - -

PRIORIDAD: Solicitud Patente EE.UU. nº serial 354.652 del día 25 de Marzo de 1.964.

- - - - -

- 2 - 3 096 1 0

20 FEB.



1879

Esta invención se refiere a una nueva composición de materia y a un proceso para la producción de la misma. Esta invención se refiere más particularmente a un nuevo compuesto, lincomicina C (U-11,921A), y a un proceso para la producción del mismo.

5 Lincomicina C es un producto biosintético producido por un actinomiceto productor de lincomicina cuando se agrega etionina a la fermentación descrita en Ejemplo 1 de patente E.U.A. - - - 3,086,921 para la producción de lincolhensina; también llamada lincomicina.

10 La lincomicina C es un compuesto básico y tiene el mismo espectro antibacteriano que la lincomicina, aunque en un mayor grado. Por lo tanto, puede ser usado de la misma manera que la lincomicina. Por ejemplo, es útil en soluciones de lavado, con propósitos sanitarios, como en el lavado de manos, y limpieza de equipo, pisos, o moblaje de habitaciones contaminadas; es también útil  
15 como un preservativo industrial, por ejemplo como un enjuague bacteriostático para lavado de ropa o para la impregnación de papel y géneros; y es útil para suprimir el crecimiento de microorganismos sensibles en las placas de ensayo y otros medios biológicos. -  
20 Puede también ser usado como un complemento alimenticio para promover el crecimiento de mamíferos y aves ya sea por si solo o en combinación con otros antibióticos.

25 Lincomicina y lincomicina C son similares en muchos aspectos, tales como, ambos antibióticos tienen un grupo básico titulable con valores de pKa similares y pesos equivalentes muy -

3 096 10



1879

aproximados; ambos antibióticos no muestran ninguna absorción en -  
la región ultravioleta y ambos tienen las mismas propiedades de so-  
lubilidad. Sin embargo, se puede demostrar que son compuestos di-  
ferentes como se demuestra por cromatografía en capa delgada usan-  
do un sistema de solvente constituido por metil etil cetona, aceto-  
na, agua (150:50:20).

Se emplearon para aislar cantidades de lincomicina C de -  
las preparaciones crudas, procedimientos tales como distribución en  
contracorriente y cromatografía con Florisil (un silicato sintético  
del tipo descrito en la Patente E.U.A. 2,393,625 y vendido por la  
Floridin Company).

El nuevo compuesto de la invención puede producirse en -  
una fermentación como se describió en Ejemplo 1, de patente E.U.A.  
3,086,912 cuando se use una cantidad efectiva de etionina que osci-  
la entre más de impurezas casuales hasta 4 mg/ml en el medio de -  
fermentación. El agregado tanto de D-etionina como DL-etionina al  
medio, da como resultado la producción de lincomicina C, pero se -  
prefiere agregar L-etionina al medio cuando se desean mayores canti-  
dades de lincomicina C.

Siempre que se utilice etionina, está presente una cierta  
cantidad de toxicidad para el cultivo del microorganismo que puede  
reducir el rendimiento final o total de lincomicina C en la fermen-  
tación. Esta toxicidad puede ser disminuida por el agregado de -  
etionina a la fermentación cuando ésta tenga una antigüedad de apro-  
ximadamente 24 a 48 horas. El agregado puede ser hecho en forma -

20 FEB 1965



5 continúa, semi continúa o por otros medios, siempre que la concentración de etionina en el medio de fermentación no afecte el crecimiento de los microorganismos hasta el punto de que la producción de lincomicina C pueda resentirse. El nivel tóxico de etionina variará con el equipo y medio usado, pero en general, un nivel menor de unos 200 mcg/ml del medio de fermentación en cualquier de terminado momento durante la fermentación no resulta tóxico.

10 El nuevo compuesto de la invención es una base nitrogenada que tiene la fórmula molecular  $C_{19}H_{36}N_2O_6S$ . Es monobásica, tiene un pKa de aproximadamente 7.73 y bajo condiciones ordinarias es más estable en la forma protonada, es decir, en forma de sal. Es soluble en alcoholes inferiores, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol, butanoles, y semejantes; ésteres alquílicos inferiores de ácidos alcanóicos inferiores, por ejemplo, acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de amilo y semejantes; alcanonas inferiores, por ejemplo, acetona, metil etil cetona, isopropil butil cetona, y semejantes; y alcanos inferiores clorados, por ejemplo, cloruro de metileno, cloroformo, dicloruro de etileno y semejantes. Tiene cierta solubilidad en agua, pero puede ser extraída de soluciones  
15 acuosas con solventes no miscibles en agua, como por ejemplo l-butanol, acetato de butilo, cloruro de metileno y semejantes.

20 La lincomicina C puede recuperarse de una fermentación de lincomicina a la que fue agregada etionina por medio del empleo del procedimiento de recuperación revelado en Patente E. U. A. - - -  
25 3,086,912. Un método preferido para recuperar la lincomicina C es

309610

20 FEB 1955



18:

utilizar adsorbentes tensioactivos, por ejemplo, carbón decolorante  
o resinas decolorantes, y eluyendo el material adsorbido con un sol-  
vente. Cualquiera de los solventes mencionados arriba pueden ser  
usados. Una resina decolorante adecuada es la Permutit DR (Patente  
5 E.U.A. 2,702,263). El fermentado total se filtra como se señala en  
la Patente E.U.A. 3,086,912 antes de pasar el fermentado sobre el -  
adsorbente tensioactivo. Los eluidos son evaporados hasta seque-  
dad y el residuo es extraído con un solvente no miscible en agua -  
del cual se recuperan el nuevo compuesto y la lincomicina. Si se -  
10 desea, ambos antibióticos pueden convertirse en la forma protonada.  
Se necesitan procedimientos posteriores para efectuar la separación  
de lincomicina y lincomicina C. Los procedimientos preferidos son,  
distribución en contracorriente y cromatografía sobre Florisil, a -  
pesar de que también pueden ser usados otros tales como la cromato-  
15 grafía con silicagel y cromatografía en columna de partición.

La extracción fraccionada líquido-líquido se lleva a cabo  
en columnas cromatográficas de partición o en un aparato para distribu-  
ción en contracorriente, usando sistemas de solventes tales como -  
ciclohexano-metil etil cetona-solución amortiguadora pH 10 (7:3:2) y  
20 1-butanol-agua (1:1).

Se lleva a cabo la recristalización disolviendo la sal -  
cristalina en agua, agregando un solvente miscible en agua, por ejem-  
plo acetona, metanol, etanol o 2-propanol y enfriando para inducir o  
completar la cristalización. Los cristales se filtran y lavan con  
25 solvente acuoso y, si se desea, con solvente anhidro, y luego se -

secan al vacío.

El nuevo compuesto de la invención puede también ser recuperado del fermentado filtrado por adsorción sobre resinas de intercambio catiónico. Pueden usarse tanto del tipo ácido carboxílico como del tipo ácido sulfónico. [Entre las resinas de tipo ácido carboxílico adecuadas se incluyen las resinas ácidas poliacrílicas obtenidas por la copolimerización del ácido acrílico y divinilbenceno por el procedimiento señalado en página 87 de Kunin, Resinas de Intercambio Iónico (Ion Exchange Resins) 2da. Edición (1958), John Wiley and Sons, Inc. Las resinas de intercambio catiónico ácido carboxílicas de este tipo se venden bajo los nombres registrados Amberlite IRC-50 y Zeokarb 226. Las resinas ácidas sulfónicas adecuadas incluyen resinas de poliestireno sulfonadas nuclearmente con ligaduras entrecruzadas con divinilbenceno que se obtiene por el procedimiento dado en página 84 de Kunin, supra. Las resinas de intercambio catiónico sulfonadas de este tipo se venden bajo los nombres registrados Dowex 50, Amberlite IR-120, Nalcite HCR, Chempro C-20, Permutit Q y Zeokarb 225].

El antibiótico se eluye de la resina con un ácido preferentemente a un pH inferior que el pKa de la resina de intercambio catiónico usada. Se obtienen resultados satisfactorios con un pH de aproximadamente 1 a 6. El eluido se ajusta entre pH 7.5 a 8.5 aproximadamente con una base, por ejemplo hidróxido de sodio, o una resina de intercambio aniónico fuertemente básica. [Son resinas de intercambio aniónico por clorometilación adecuadas para este propósito las obtenidas - -



por el procedimiento dado en páginas 88 y 97 de Kunin, supra, poli-  
lietireno, con ligaduras entrecruzadas si se desea con divinil -  
benceno, preparado por el procedimiento dado en página 84 de Kunin,  
supra, y cuaternando con trimetilamina o dimetiletanolamina por  
5 el procedimiento dado en página 97 de Kunin, supra. Las resinas -  
de intercambio aniónico, de este tipo son vendidas bajo los nombres  
registrados Dowex 2, Dowex 20, Amberlite IRA-400, Duolite A-102 y  
Permutit S-1].

El nuevo compuesto de la invención puede purificarse por  
10 transferencias sucesivas de la forma protonada a la no protonada  
da y viceversa, especialmente interviniendo otros tipos de trata-  
miento, por ejemplo, extracciones con solvente y lavados, extraccio-  
nes cromatográficas y fraccionadas líquido-líquido. De esta mane-  
ra pueden emplearse sales de lincomicina C para aislar o mejorar el  
15 antibiótico. Por ejemplo, el antibiótico puede convertirse en una  
sal insoluble tal como el picrato, que puede ser sometido a proce-  
dimientos de purificación y luego usarse para regenerar la base li-  
bre antibiótica por tratamiento con álcali. O el antibiótico puede  
ser convertido en sal soluble en agua, tal como clorhidrato o sulfa-  
20 to, y la solución acuosa de la sal puede ser extraída con varios -  
solventes no miscibles en agua antes de regenerar la base libre an-  
tibiótica por tratamiento con álcali de la solución así extraída -  
por ácido.

Las sales de lincomicina C pueden usarse para los mismos  
25 propósitos biológicos que la base libre o pueden emplearse para me-

---

309610

20 FEB 1965



1879

jorar el antibiótico según se describió anteriormente.

Las sales ácidas específicas pueden prepararse neutralizando la base libre con el ácido apropiado a pH inferior, aproximadamente 7.0 y preferentemente entre pH 2 y pH 6, aproximadamente. Los ácidos adecuados para este propósito incluyen ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, succínico, cítrico, láctico, maleico, fumárico, pámico, cólico, palmítico, mícico, canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, 3-fenil-salícico, 5-fenilsalicílico, 3-metilglutárico, ortosulfobenzoico, ciclohexanosulfámico, ciclopentanopropiónico, 1.2-ciclohexanodicarboxílico, 4-ciclohexenocarboxílico, octadecenilsuccínico, octenilsuccínico, metanosulfónico, bencenosulfónico, heliántico, de Reinecke; dimetilditiocarbámico, sórbico, monocloracético, undecilénico, 4'-hidroxi-azobenceno-4-sulfónico, octadecilsulfúrico, pícrico, benzóico, cinámico y similares.

El nuevo compuesto de la invención ha sido aislado en dos formas cristalinas. Los cristales que precipitaron en forma de agujas se designaron como la forma I y los cristales en forma de cubos se designaron como forma II. El espectro infrarrojo de la forma I se asemeja a aquel de la forma I del clorhidrato de lincomicina, mientras que el espectro infrarrojo de la forma II, se asemeja a aquel de la forma II del clorhidrato de lincomicina.

El nuevo compuesto de la invención, que incluye ambas formas cristalinas I y II, es activo contra bacterias, por ejemplo, Streptococcus lactis, que causa la agrura de la leche y puede

3 096 10

20 FEB. 1965



- 9 -

1879

5 usarse para prevenir o retardar el enranciamiento de los productos lácteos, por ejemplo, leche y queso. Pueden ser usadas concentraciones tan bajas como 0.8 mg/ml. El nuevo compuesto puede también usarse para inhibir gérmenes gram-positivos formadores de esporos que se difunden sobre placas de agar cuando se aislan mohos, levaduras, actinomicetos y organismos gram-negativos. Pueden ser usados, por ejemplo, en el aislamiento de microorganismos en muestras de suelo, lo mismo que en el aislamiento de microorganismo gram-negativos, por ejemplo, Pseudomonas, Proteus y Escherichia coli de -

10 infecciones mixtas en presencia de estafilococos y/o estreptococos. El nuevo compuesto de la invención también es activo contra - - Staphylococcus aureus 552 y S. aureus 771 que son resistentes a - la penicilina, estreptomycin, tetraciclina y eritromicina.

152 Los siguientes ejemplos son ilustrativos del proceso y de los productos de la presente invención, pero no deben interpretarse como los únicos. Todos los porcentajes están expresados en peso y todas las proporciones de mezcla de solventes lo están en volumen salvo que se indique de otra manera.

Ejemplo 1 Lincomicina C.

20

#### FERMENTACION

Un cultivo de suelo de Streptomyces lincolnensis var. - lincolnensis, NRRL 2936, en tubo inclinado se usó para inocular una serie de frascos Erlenmeyer de 500 ml cada uno conteniendo 100 ml de medio de siembra constituido por los ingredientes siguientes:

3.09610



- 10 -

187

Yeastolac*	10 g
Glucosa monohidratada	10 g
N-Z-amina B**	5 g
Agua potable c.s.	1 litro

5 \* Yeastolac es un hidrolisado de proteína de células de levadura.

\*\*N-Z-amina B es un digerido enzimático de caseína Sheffield.

El pH del medio de siembra antes de la esterilización era 7.3. La siembra se hizo crecer durante 2 días a 28°C en un agitador rotatorio Gump operando a 250 rpm.

10 Un inóculo al 5% del medio de siembra descrito anteriormente (5 ml) se agregó a cada uno de 30 frascos Erlenmeyer de 500 ml conteniendo cada uno 100 ml del siguiente medio de fermentación:

Glucosa monohidratada	15 gm
Almidón	40 gm
Melazas	20 gm
Licor de Peptona Wilson No.159*	10 gm
Licor de Macerado de Maíz	20 gm
Carbonato de Calcio	8 gm
Aceite de manteca de cerdo	0.5 ml
Agua potable, c.s.p.	1 litro

15

20

\*Licor de Peptona Wilson No.159 es una preparación de proteínas de origen animal hidrolizadas enzimáticamente.

En el momento de la inoculación, se agregó DL-etionina -



en una concentración final de 2 mg/ml.

Los frascos de agitación se recolectaron después de 4 días de fermentación a 28°C en un agitador rotatorio Gump a 250 rpm. Su valoración fue de 200 mcg/ml en el ensayo S. lutea, descrito aquí -  
5 más adelante. Los sólidos totales del fermentado fueron aproximadamente 20 gm/litro.

De la misma manera se realizaron fermentaciones sustituyendo a la DL-etionina por L-etionina y la DL-ationina por D-etio -  
nina.

10

#### PURIFICACION

De una fermentación con DL-etionina se filtró el fermentado total (235 litros), a pH de recolección, usando un coadyuwan -  
te de filtración según se requiere. El conglomerado de micelio -  
se lavó con agua y el conglomerado luego se descartó. El fermentado -  
15 filtrado y el agua de lavados (275 litros) se revolvieron durante 45 minutos con 12.5 Kg de carbón activado y 2.5 Kg de tierra de diatomeas. La mezcla se filtró y el filtrado se descartó. -  
El conglomerado de carbón se lavó con 60 litros de agua y el agua -  
del lavado se descartó. El conglomerado se lavó con 70 litros -  
de acetona acuosa al 20% y el lavado de acetona acuosa al 20% se -  
20 descartó. El conglomerado fue entonces eluido dos veces con porciones de 100 litros de acetona acuosa al 90%. Los eluidos se mezclaron (215 litros) y la solución se concentró (18 litros). -  
Este concentrado se ajustó a un pH de 10.0 con solución de hidróxido de sodio acuoso al 50% y se extrajo tres veces con porciones  
25



de 20 litros de cloruro de metileno. Los extractos de cloruro de metileno se mezclaron (60 litros) y luego se concentraron para dar una preparación oleosa (7.14 g) conteniendo lincomicina y lincomicina C en cantidades iguales y ambas bajo la forma de base libre. Esta preparación entonces se disolvió en 200 ml de cloruro de metileno. La solución se clarificó por filtración y entonces se concentró hasta sequedad al vacío. El residuo se disolvió en 100 ml de cloruro de hidrógeno metanólico 1 N. La solución metanólica fue entonces mezclada con 3.2 litros de éter mientras se revolvió. El precipitado resultante incoloro, crudo, de clorhidrato de lincomicina y clorhidrato de lincomicina C se aisló por filtración y se secó; rendimiento 7.14 g con una valoración de 940 mcg/mg contra Sarcina lutea. (La valoración contra Sarcina lutea se conduce sobre agar amortiguado a pH 6-8 con amortiguador fosfato pH 7.0 [0.1M]. Se coloca un volumen unitario [0.08 ml] de solución conteniendo el material a ensayar sobre un disco de valoración de 12.7 ml que entonces se coloca sobre una placa de agar sembrada con el microorganismo de ensayo). La cromatografía en capa delgada demostró la presencia tanto de clorhidrato de lincomicina como de clorhidrato de lincomicina C en cantidades aproximadamente iguales.

Ejemplo 2

El clorhidrato de lincomicina C crudo (7.0 g) como se obtiene en Ejemplo 1, se disolvió en 20 ml de agua y 20 ml de butanol, se ajustó el pH hasta 4.2 con HCl 1 N, y se distribuyó la solución -



en un aparato distribuidor en contracorriente para 1000 transferencias. El análisis por cromatografía en capa delgada demostró que las fracciones en los tubos 135 a 190 contenían lincomicina C. Estas fracciones se mezclaron y la solución se concentró hasta estado acuoso y se secó por congelación para dar 2.44 gm de clorhidrato de lincomicina C cuya valoración era 1400 mcg/mg contra Sarcina Lutea. Quinientos mg de esta preparación se disolvieron en 2 ml de agua, 1 ml de metanol y 100 ml de acetona. La solución se clarificó por filtración. El filtrado se mezcló con éter hasta que aparecieron cristales. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante una hora. El clorhidrato de lincomicina C cristalina (cubos) se separó de la solución sobrenadante del material por decantación. Estos cristales se recrystalizaron de 1 ml de agua, 1 ml de metanol, 80 ml de acetona y 20 ml de éter; rindieron 250 mg de clorhidrato de lincomicina C cristalina (en cubos). El sobrenadante (obtenido como se describe anteriormente) se dejó en reposo a 5° C durante 4 horas. El clorhidrato de lincomicina C cristalino (agujas) que precipitó se filtró y se secó; rindió 150 mg de clorhidrato de lincomicina C cristalina (agujas).

20

#### CARACTERIZACION DEL CLORHIDRATO DE LINCOMICINA C

Espectro de Absorción Ultravioleta: El clorhidrato de lincomicina C no muestra ninguna absorción máxima en la escala de 220-400 m $\mu$ .

Titulación: La titulación potenciométrica muestra la pre

309610 20 FEB. 1965



- 13 -

187,

sencia de un grupo básico titulable con un pKa' de 7.73.

Solubilidad: El clorhidrato de lincomicina C es soluble en agua y metanol. Es moderadamente soluble en etanol al 95% o etanol absoluto y relativamente insoluble en acetona, acetato de etilo, solventes hidrocarburos clorados y saturados.

5

Peso Molecular: Hallado  $490 \pm 20$  (por titulación potenciométrica).

Cromatograma en papel: El diseño de cromatografía en papel de clorhidrato de lincomicina C en los siguientes sistemas de solventes es como se demuestra en FIGURA I de los dibujos:

10

I 1-butanol, agua (84:16), 16 horas

II 1-butanol, agua (84:16) + ácido p-toluenosulfónico al 0.25%, 16 horas

III 1-butanol, ácido acético, agua (2:1:1), 16 horas

15

IV Piperidina al 2% (v/v) n-butanol, agua (84:16), 16 horas

V 1-butanol, agua (4:96), 5 horas

VI 1-butanol, agua (4:96) + ácido p-toluenosulfónico al 0.25%, 5 horas

20

La siguiente es una caracterización de las dos formas cristalinas I y II de clorhidrato de lincomicina C:

FORMA I

Aspecto Cristalino: Agujas

Rotación Específica:  $[\alpha]_D^{25} = +140.5^\circ$  (c, 0.427, agua)

25

Análisis Elemental: Calculado para  $C_{19}H_{36}N_2O_6 \cdot HCl \cdot H_2O$

309610

20 FEB 1965



- 14 -

1819

C, 48.04; H, 8.26; N, 5.90; Cl, 7.46;

S, 6.75; O, 23.59

Hallado: C, 48.02; H, 8.35; N, 6.05; Cl, 7.73;

S, 7.03; O, 22.82 (por diferencia)

5 IR: El espectro infrarrojo de clorhidrato de lincomicina  
C cristalino, forma I, en una mezcla de aceite mine-  
ral, como se demuestra en FIGURA II de los dibujos  
(la curva superior representa la mezcla de aceite mi-  
neral, mientras que la curva inferior representa la

10 suspensión de antibióticos en la mezcla de aceite mi-  
neral), expresado en  $\text{cm}^{-1}$  es como sigue:

	3300 (F)	1210 (M)
	3060 (F)	1140 (M)
	2920 (F) (Aceite)	1094 (F)
15	2850 (F) (Aceite)	1073 (F)
	2720 (M)	1048 (F)
	2340 (D)	1000 (M)
	1680 (F)	990 (M)
	1568 (M)	965 (M)
20	1456 (F) (Aceite)	932 (D)
	1375 (F)	900 (D)
	1363 (F) (Aceite)	890 (D)
	1333 (M)	865 (M)
	1318 (M)	795 (M)
25	1300 (M)	708 (M)

309610

20 FEB 1965



1262 (F)	675 (M)
1230 (M)	660 (M)

FORMA II

Aspecto de los Cristales: Cubos

5

Rotación Específica:  $[\alpha]_D^{25} = + 143^\circ$  (c, 0.620, agua)

Análisis Elemental: Calculado para  $C_{19}H_{36}N_2O_6 \cdot HCl \cdot H_2O$

Hallado : C, 48.07; H, 8.30; N, 6.48; S, 6.94

Cl, 7.54; O, 22.67 (por diferencia).

10

IR: El espectro infrarrojo del clorhidrato de lincomicina C cristalino, forma II, en una mezcla de aceite mineral, como se demuestra en FIGURA III de los dibujos (la curva superior representa la mezcla de aceite mineral mientras que la curva inferior representa la suspensión de antibiótico en la mezcla del aceite mineral), expresado en  $cm^{-1}$  es como sigue:

15

3550 (M)	1450 (F)	1070 (F)
3440 (F)	1420 (M)	1040 (F)
3340 (F)	1400 (M)	1000 (M)
3210 (F)	1370 (F)	990 (M)
3070 (F)	1360 (M)	975 (M)
3020 (F)	1345 (M)	960 (M)
2920 (F) (Aceite)	1320 (M)	935 (D)
2850 (F) (Aceite)	1290 (M)	900 (D)
2720 (M)	1260 (F)	865 (M)
1673 (M)	1225 (M)	800 (M)

20

25

3 09610



- 16 -

	1650 (F)	1200 (M)	730 (D)
	1610 (D)	1145 (M)	715 (M)
	1560 (F)	1140 (M)	705 (M)
	1555 (F)	1095 (F)	660 (M)
5	1535 (M)		

Las intensidades de bandas en el espectro infra-  
 rojo anterior se indican como "F", "M" y "D" respectivamente, y  
 son aproximadas en base al fondo del espectro en la vecindad  
 10 de las bandas. Una banda "F" es del mismo orden de intensidad  
 que la banda más fuerte en el espectro; las bandas "M" tienen  
 entre un tercio y dos tercios la intensidad de la banda más  
 fuerte y las bandas "D" tienen menos de un tercio la intensi-  
 dad de la banda más fuerte.

15

- - - - -

N O T A.-

=====

20

La presente patente de invención, comprende las  
 siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento para la producción de linco-  
 micina C, caracterizado porque comprende cultivar Streptomyces  
 25 lincolnensis var. lincolnensis en un medio nutritivo acuoso  
 conteniendo etionina, en una cantidad efectiva que oscila entre

309610



- 17 -

más de impurezas casuales hasta 4 mg/ml de medio nutritivo acuoso, bajo condiciones aeróbicas hasta que una actividad substancial sea impartida a dicho medio por producción de lincomicina C y aislar la lincomicina C así producida.

5                    2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el medio nutritivo acuoso contiene DL-etionina en una cantidad efectiva que oscila entre más de impurezas casuales hasta 4 mg/ml de medio nutritivo acuoso.

10                   3.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el medio nutritivo acuoso contiene L-etionina en una cantidad efectiva que oscila entre más de impurezas casuales hasta 4 mg/ml de medio nutritivo acuoso.

15                   4.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el cultivo se efectúa a una temperatura entre 18°C y 37°C aproximadamente, durante un período entre 2 a 10 días aproximadamente.

20                   5.- Procedimiento, caracterizado porque comprende cultivar Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis en un medio nutritivo acuoso conteniendo etionina, en una cantidad efectiva que oscila entre más de las impurezas casuales hasta 4 mg/ml de medio nutritivo acuoso, una fuente de carbohidrato asimilable y nitrógeno asimilable bajo condiciones aeróbicas, hasta que una actividad substancial sea impartida a dicho medio por la producción de lincomicina C y aislar la lincomicina C así producida.

25

6.- Procedimiento, caracterizado porque para la recuperación de lincomicina C de un líquido de fermentación

309510



- 18 -

conteniendo lincomicina C y lincomicina se procede según las siguientes fases:

- 1) filtrar el líquido de fermentación,
- 2) revolver el fermentado filtrado con carbón y tierra de diatomeas para formar una suspensión,
- 5 3) filtrar la suspensión para obtener un conglomerado de carbón y tierra de diatomeas,
- 4) eluir el conglomerado de carbón y tierra de diatomeas con acetona,
- 10 5) secar por congelación los eluidos,
- 6) extraer los eluidos secados por congelación con solventes no miscibles en agua,
- 7) concentrar el extracto hasta un sólido seco,
- 8) tratar el sólido seco con ácido clorhídrico y
- 15 9) someter el sólido seco tratado por ácido clorhídrico a extracción fraccionada líquido-líquido para obtener clorhidrato de lincomicina C.

7.- Procedimiento para la producción de lincomicina C.

20 Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva y se ilustra con los planos que a la misma se acompañan, la cual consta de diez y ocho hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 20 Febrero 1.965.

**CARLOS ROEB**

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'C. Roeb', written over a small rectangular stamp.



309610

FIGURA II

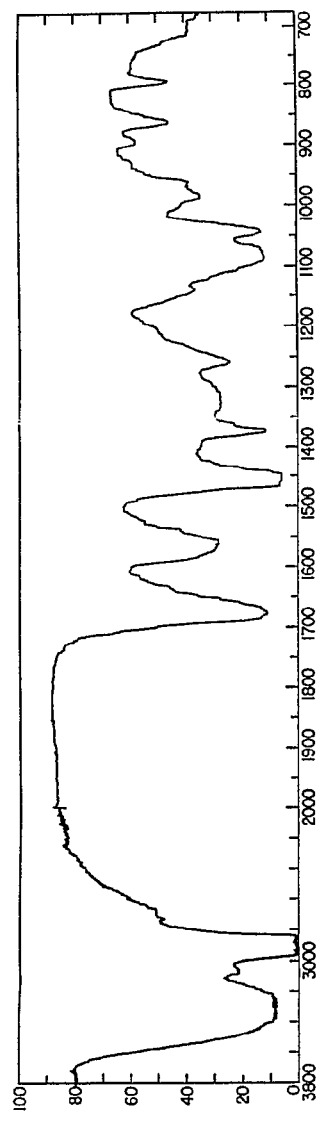


FIGURA III

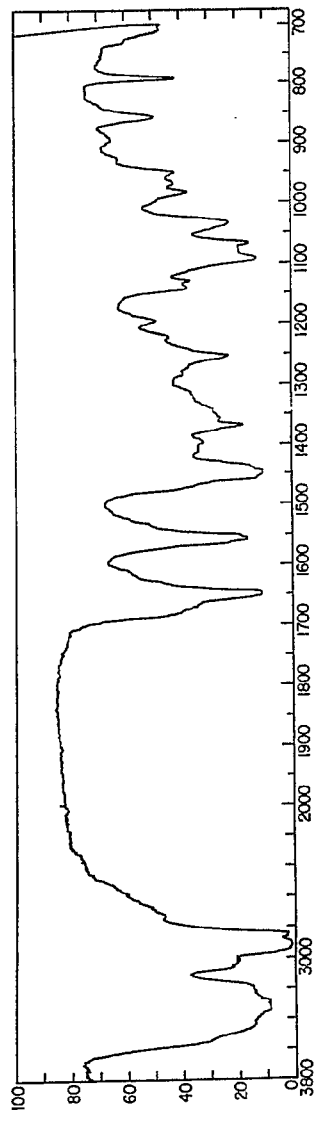
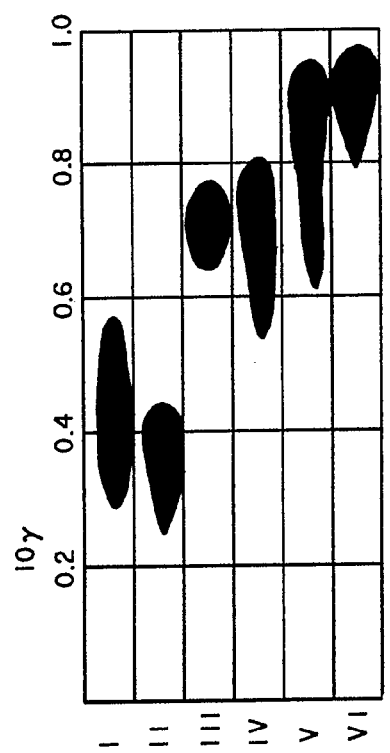


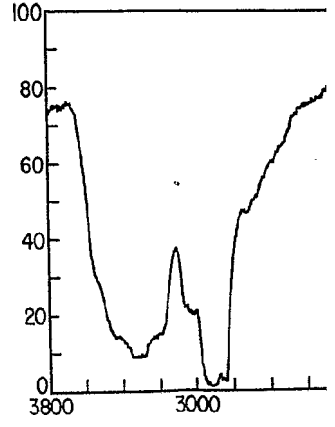
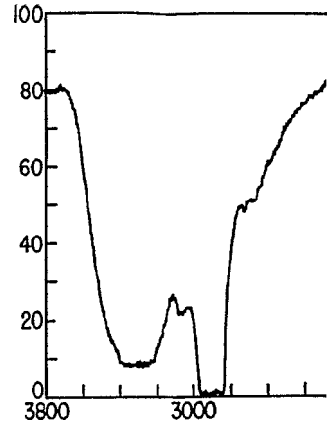
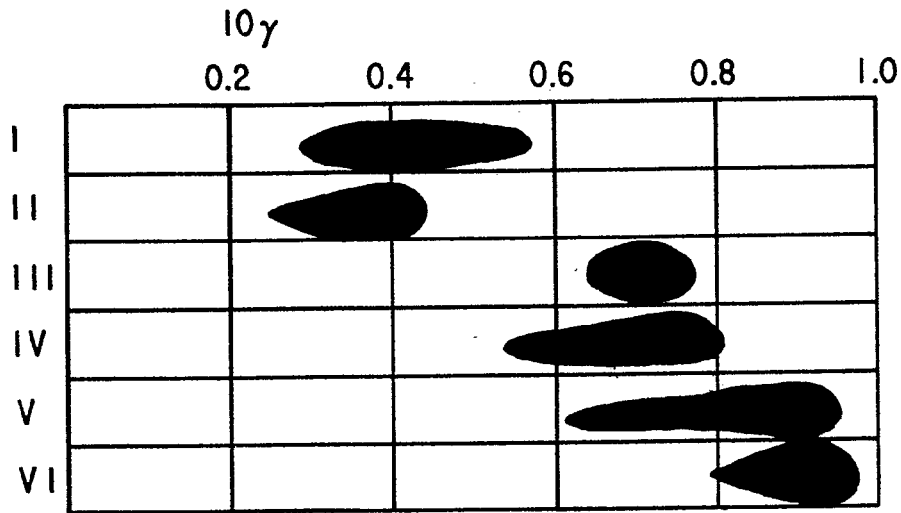
FIGURA I

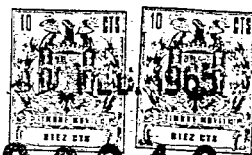


ESCALA VARIABLE

*[Handwritten signature]*

FIGURE I





309610

FIGURA II

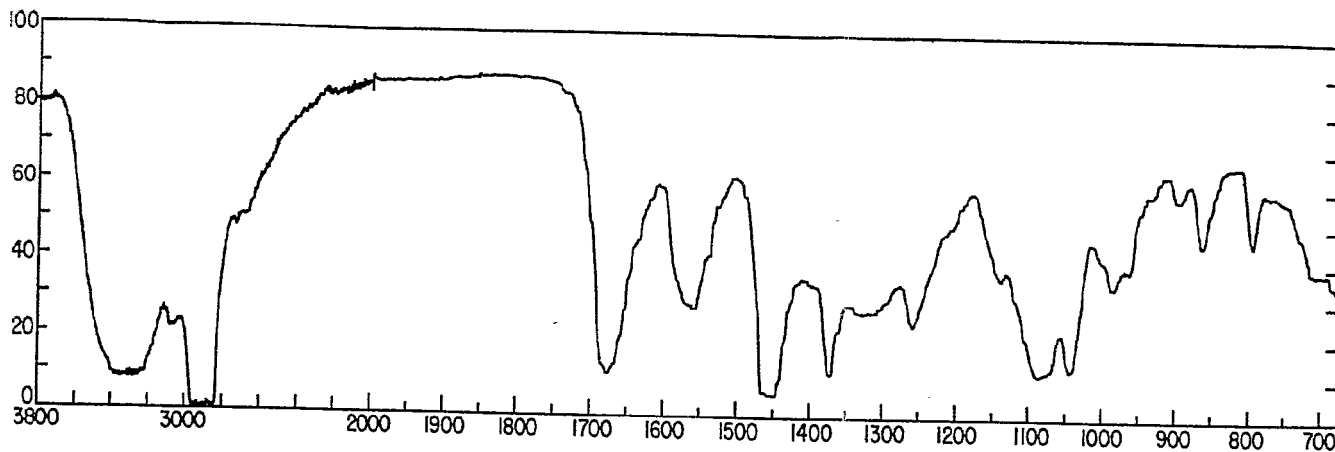
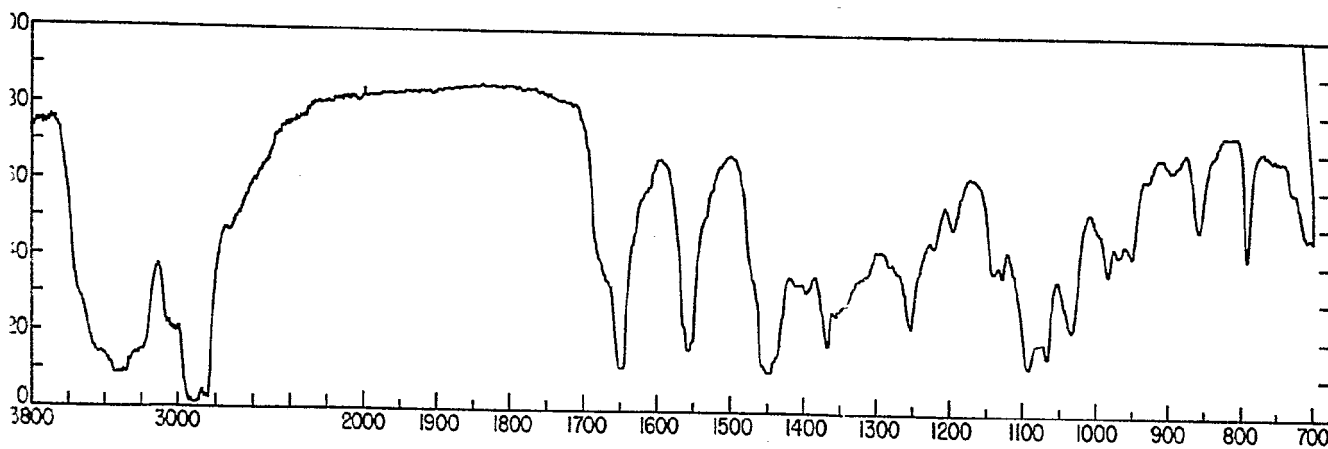


FIGURA III



ESCALA VARIABLE

*[Handwritten signature]*