

309611

20



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 PREPARACION DE LINCOMICINA B"

INVENTORES: Alexander Demetrious Argoudelis, de nacionalidad griega, y John A. Fox, de nacionalidad norteamericana, y Malcolm Edward Bergy, de nacionalidad norteamericana.

PRIORIDAD: Solicitud Patente EE.UU. nº Serial 354.688 del día 25 de Marzo de 1.964.



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 B, (U-21699), y a un proceso para la preparación del mismo.

5

En la Patente E.U.A. 3,086,912 se describe un proceso de fermentación y de recuperación para la producción del antibiótico lincomicina, también denominado lincolnensin. La presente invención está basada en el descubrimiento de que preparaciones de lincomicina cruda contienen un material antibiótico desconocido hasta ahora. El material antibiótico, que es denominado lincomicina B, tiene el mismo espectro para organismos sensitivos que la lincomicina, aunque en menor grado. Por lo tanto puede ser utilizado de la misma manera que la lincomicina, por ejemplo, es útil para soluciones de lavado, con propósitos sanitarios, como ser en el lavado de las manos, y limpieza del equipo, pisos o muebles de habitaciones contaminadas; también es útil como un preservativo industrial, por ejemplo, como un enjuague bacteriostático para ropas lavadas y para impregnación de papeles y tejidos; y es útil para suprimir el crecimiento de organismos sensibles en las placas de ensayo, y otros medios biológicos. También puede ser usado como un suplemento alimenticio para promover crecimiento de mamíferos y aves, ya sea por sí solo o en combinación con antibióticos.

10

15

20

25

La lincomicina y lincomicina B son similares en muchos aspectos; por ejemplo, ambos antibióticos tienen un grupo titulable básico con valores de pK_a similares y pesos equivalentes muy cerca

3 0961 11

-3-

20 F



1796

5 nos, ambos antibióticos no presentan absorción en la región del ultravioleta, y ambos tienen las mismas propiedades de solubilidad. Sin embargo, estos antibióticos son apreciablemente distintos como se demuestra por la cromatografía en capa delgada usando un sistema solvente constituido por metil etil cetona, acetona, agua (150:50:20).

10 Procedimientos tales como la distribución en contracorriente y la cromatografía con Florisil (un silicato sintético del tipo descrito en Patente E.U.A. 2,393,625 y vendido por la Floridan Company) se emplearon para aislar cantidades de lincomicina B a partir de preparaciones crudas.

15 El nuevo compuesto de la invención se produce en una fermentación como se describe en Ejemplo 1 de la Patente E.U.A. 3,086,912. Por lo tanto, una fuente de lincomicina B es un fermentado total de una fermentación de lincomicina como se señala en Ejemplo 1, de Patente E.U.A. 3,086,912.

20 El nuevo compuesto de la invención es una base nitrogenada que tiene la fórmula molecular $C_{17}H_{32}N_2O_6S$. Es monobásico, tiene un pK_a de alrededor de 7.46-7.68, y bajo condiciones ordinarias es más estable en la forma protonada, es decir en la forma de sal. Es soluble en alcoholes inferiores, e.g., metanol, etanol, isopropanol, los butanoles y semejantes; ésteres alquílicos inferiores y ácidos alcanoicos inferiores, e.g., acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de amilo y semejantes; alcanonas inferiores, e.g., acetona, metil etil cetona, isopropil butil cetona, y semejantes; y alcanos -

25



inferiores clorados, e.g., cloruro de metileno, cloroformo, dicloruro de etileno y semejantes. Tiene cierta solubilidad en agua pero puede ser extraído de soluciones acuosas con solventes no miscibles en agua, e.g., l-butanol, acetato de butilo, cloruro de metileno y semejantes.

5

Lincomicina B puede ser recuperada de una fermentación de lincomicina empleando los procedimientos de recuperación señalados en Patente E.U.A. 3,086,912. Un método preferido para la recuperación de lincomicina B es utilizar adsorbentes tensioactivos, por

10

ejemplo, carbón decolorante o resinas decolorantes y eluir el material adsorbido con un solvente. Puede ser utilizado cualquiera de los solventes mencionados más arriba. Una resina decolorante adecuada es Permutita DR (Patente E.U.A. 2,702,263). El fermentado total se filtra como se señala en Patente E.U.A. 3,086,912 antes de

15

hacer pasar el fermentado sobre el adsorbente tensioactivo. Los eluidos se evaporan hasta sequedad y el residuo se extrae con un solvente no miscible en agua del cual se recupera el nuevo compuesto y lincomicina. Son necesarios otros procedimientos para efectuar

20

una separación de lincomicina y lincomicina B. Son procedimientos preferidos la distribución en contracorriente y la cromatografía con Florisil, aunque también pueden ser usados otros, tales como cromatografía con sílica gel y cromatografía con columna de partición.

25

La extracción fraccionada líquido-líquido se lleva a cabo en un aparato distribuidor en contracorriente, usando sistemas de solventes tales como ciclohexano-metil etil cetona- solución amorti

309611

-5-

20 F-
179



guadora pH 10 (7:3:2) y 1-butanol-agua (1:1) o sobre columnas de partición cromatográficas.

5 La purificación final se lleva a cabo convirtiendo la lincomicina B en una sal, ventajosamente el clorhidrato y cristalizando este último esencialmente de una solución de acetona por el agregado de éter.

10 El nuevo compuesto de la invención también puede ser recuperado del fermentado filtrado por adsorción sobre resinas de intercambio catiónico. Pueden ser usados tanto el ácido tipo carbónico como sulfónico. [Las resinas ácido carboxílicas adecuadas incluyen las resinas ácido poliacrílico obtenidas por la copolimerización de ácido acrílico y divinilbenceno por el procedimiento dado en página 87 de Kunin, Resinas de Intercambio Iónico (Ion Exchange Resins) 2da. edición (1958), John Wiley and Sons, Inc. 15 Las resinas de intercambio de catión ácido carboxílico de este tipo son comercializadas bajo las marcas de fábrica Amberlite IRC-50, y Zeokarb 226. Las resinas de ácido sulfónico adecuadas incluyen resinas de poliestireno sulfonado nuclear, con ligaduras entrecruzadas con divinil-benceno que se obtienen por el procedimiento dado en página 84 de Kunin, supra. Las resinas de intercambio catiónico sulfonado de este tipo son comercializadas bajo las marcas de 20 fábrica Dowex 50, Amberlite IR-120, Nalcite HCR, Chempro C-20, Permutita Q, y Zeokarb 225.]

25 El antibiótico es eluido de la resina con un ácido, ventajosamente a un pH inferior que el pKa' de la resina de intercambio-

309611

20 FEB 1958



-6-

179

5 cationico usada. Se obtienen resultados satisfactorios con un pH de aproximadamente 1 a 6. El eluido se ajusta a aproximadamente pH 7.5 a 8.5 con una base, e.g., hidróxido de sodio, o una resina de intercambio aniónico fuertemente básica. [Las resinas de intercambio aniónico adecuadas para este propósito se obtienen por cloro
10 metilación mediante el procedimiento dado en páginas 88 y 97 de Kunin, supra, de poliestireno con ligaduras entrecruzadas si se desea, con divinilbenceno, preparadas por el procedimiento dado en página 84 de Kunin, supra, y cuaternando con trimetilamina o dimetil-
15 etanolamina por el procedimiento dado en página 97 de Kunin, supra. Las resinas de intercambio aniónico de este tipo están comercializadas bajo las marcas de fábrica Dowex 2, Dowex 20, Amberlite IRA-400, Duolite A-102 y Permutita S-1.]

15 El nuevo compuesto de la invención puede purificarse por sucesivas transferencias de la forma protonada a la forma no protonada y viceversa, especialmente con otros tipos de tratamiento como por ejemplo, extracciones con solventes y lavados, cromatografía y extracciones fraccionadas líquido-líquido. De esta manera -
20 pueden emplearse sales de lincomicina B para aislar o mejorar el antibiótico. Por ejemplo el antibiótico puede convertirse en una sal insoluble, tal como el picrato, que puede someterse a procedimientos de purificación y luego usarse para regenerar la base libre del antibiótico por tratamiento con álcali; o el antibiótico puede
25 ser convertido en una sal soluble en agua, tal como el clorhidrato o sulfato y la solución acuosa de la sal extraerse con varios sol-



5 ventes no miscibles en agua antes de la regeneración de la base libre del antibiótico por tratamiento con álcali de la solución así extraída por ácido. Las sales de lincomicina B pueden utilizarse para los mismos propósitos biológicos como la base libre o pueden ser empleadas para mejorar el antibiótico como se describió anteriormente.

10 Las sales ácidas específicas pueden prepararse por neutralización de la base libre con el ácido apropiado hasta por debajo de aproximadamente pH 7.0 y ventajosamente hasta alrededor de pH 2 a pH 6. Los ácidos adecuados para este propósito incluyen el ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, succínico, cítrico, láctico, maleico, fumárico, pamoico, cólico, palmítico, múxico, canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, 3-fenilsalicílico, 5-fenilsalicílico, 3-metilglutárico, 15 orto-sulfobenzoico, ciclohexanosulfámico, ciclopentanopropiónico, 1,2-ciclohexanodicarboxílico, 4-ciclohexanocarboxílico, octadecenil succínico, octenilsuccínico, metanosulfónico, bencenosulfónico, heliántico, de Reinecke, dimetilditiocarbámico, sórbico, monocloroacético, undecilénico, 4'-hidroxiazobenceno-4-sulfónico, octadecilsulfúrico, 20 pícrico, benzóico, cinámico y semejantes.

25 El nuevo compuesto de la invención tiene la propiedad de afectar adversamente el crecimiento de varios microorganismos, particularmente bacterias y puede ser usado ya sea como la base libre o como una sal por adición de ácido, aisladamente o en combinación con otros agentes antibacterianos, para prevenir el crecimiento o

309611

20 FEB 1965



-8-

1796

para reducir el número de microorganismos presentes en varios ambientes, por ejemplo, en plantas y en animales, tales como mamíferos, aves, peces, reptiles y seres humanos, en los que el microorganismo infectante es susceptible al antibiótico. Puede también ser usado como un suplemento alimenticio para promover el crecimiento de animales, por ejemplo, mamíferos, aves, peces y reptiles. La lincomicina B inhibe el crecimiento del Staphylococcus aureus, Streptococcus lactis, y Streptococcus viridans. Por lo tanto, el nuevo compuesto puede utilizarse como un desinfectante para diferentes equipos dentales y médicos, contaminados con Staphylococcus aureus; también puede ser usado como un desinfectante para utensilios alimenticios contaminados con este organismo, lavados y apilados. También, como la lincomicina B es activa contra Streptococcus lactis, que produce la agrura de la leche, puede ser utilizada para evitar o retardar el enranciamiento de productos lácteos, por ejemplo, leche y queso. El nuevo compuesto puede también usarse para inhibir los gérmenes gram-positivos formadores de esporos que se difunden sobre placas de agar cuando se aíslan mohos, levaduras, actinomicetas, y microorganismos gramnegativos. Puede ser usado, por ejemplo, en el aislamiento de microorganismos en muestras de suelo, lo mismo que en el aislamiento de microorganismos gramnegativos, por ejemplo, Pseudomonas, Proteus y Escherichia Coli, de infecciones mixtas en presencia de estafilococos y/o estreptocócicos. Ratonés infectados con Staphylococcus aureus fueron protegidos por vía oral con una dosis terapéutica media de 8.1 (4.0-12.2) mg/kg de base



libre de lincomicina B.

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

5

Ejemplo 1 Base libre de lincomicina B

A. Recuperación

10

El fermentado total de un procedimiento de fermentación como se describe en Ejemplo 1, Patente E.U.A. 3,086,912 (26,400 galones con un título de 572 mcg/ml) se ajustó a pH 3.0 con 305 gal. de ácido sulfúrico al 60% y se filtró a 20°C, sobre un filtro previamente recubierto utilizando 5,800 lbs. de tierra de diatomeas como el prerrecubrimiento y sin agregar mezcla al fermentado total.

15

El fermentado filtrado (24,000 galones con un título de 318 mcg/ml) se ajustó a pH 8.0 con solución de hidróxido de sodio al 50%, se calentó a 45°C y se bombeó a través de un filtro prensa clarificante, un medidor de flujo y hacia abajo a través de 5 columnas de carbón conectadas en serie. Cada columna de carbón contenía 240 lbs. de carbón granulado malla 40.

20

El fermentado filtrado se hizo pasar comenzando a razón de 20 gal. por minuto y terminando a razón de 10 gal. por minuto. Las columnas de carbón entonces fueron lavadas en forma seriada (hacia adelante) hacia abajo con 1160 galones de agua caliente (50°C) a razón de 4 gal. por minuto. Las columnas fueron entonces sopladadas hasta sequedad y eluí

25

3096111

20 FEB.



-10-

179

das en series inversas hacia abajo con 200 gal. de acetona al 99% a 40°C a razón de 3 galones por minuto, seguido por 2300 galones de acetona acuosa al 75% a 50°C a razón de 2 galones por minuto. Los eluidos de acetona se mezclaron y concentraron bajo presión reducida hasta un concentrado acuoso (80 galones con un título de 80,000 mcg/ml). El concentrado acuoso se enfrió a 28°C, se ajustó a pH 10.6 con 1.5 galones de solución de hidróxido de sodio al 50% y se extrajo con 80 galones de cloruro de metileno. El concentrado acuoso se extrajo cinco veces más con 20 galones de cloruro de metileno cada vez. Los extractos de cloruro de metileno se filtraron a través de 15 lbs. de tierra de diatomeas y se concentraron hasta un volumen de 20 galones bajo vacío. Se agregó agua deionizada (9.5 galones) y la concentración se continuó hasta un volumen de 14 galones. El concentrado se llevó hasta un volumen de 19 galones por el agregado de 5 galones de agua deionizada, se enfrió a 28°C y se ajustó a pH 1.0 con 1.5 galones de ácido clorhídrico concentrado. Se agregó acetona (190 galones) a la solución acuosa acidificada y la mezcla se enfrió hasta 10°C y se revolvió durante la noche; la pérdida por evaporación fue de 29 galones. Los sólidos se filtraron en un recipiente filtrante de 36 pulgadas y se lavaron con 8 galones de acetona al 100%; el peso neto del material cristalino crudo fue 30.75 Kg. Los 30.75 Kg se disolvieron en 8.5 galones de agua deionizada caliente (1 litro/kg) y se filtraron a través de 5 libras de tierra de diatomeas. El filtrado se revolvió con 85 galones de acetona caliente (35°C), la mezcla se

309611

20 FEB 1965



-11-

1790

5 sembró con cristales de lincomicina, y la agitación se continuó durante 3 horas mientras se enfriaba hasta 10°C. Los cristales se filtraron en un recipiente filtrante de 36 pulgadas, se lavaron con 5 galones de acetona y secaron bajo vacío a 60°C durante 48 horas; rendimiento 24.3 kg de clorhidrato de lincomicina. Los licores madre y lavado de los pasos de cristalización anteriores se concentraron hasta una concentración acuosa (13.2 litros), y se ajustó un litro de este concentrado (pH 4.9) a pH 9.5 por agregado de solución de hidróxido de sodio 2 N y se extrajo tres veces con 400 ml de cloruro de metileno. El extracto de cloruro de metileno se concentró hasta sequedad para dar 85.0 gramos de una mezcla de base libre de lincomicina y base libre de lincomicina B.

B. Distribución en contracorriente.

15 Diez gramos de esta mezcla de lincomicina y lincomicina B se disolvieron en 75 ml de la fase inferior de un sistema de solventes constituido por volúmenes iguales de 1-butanol y agua. La solución se ajustó a pH 4.2 por el agregado de ácido clorhídrico acuoso 1 N, se mezcló con un volumen igual de la fase superior del sistema anteriormente mencionado y se transfirió a un aparato de distribución en contracorriente Craig, todo de vidrio (10 ml por fase). Después de 800 transferencias la distribución se analizó por determinación de sólidos y cromatografía en capa delgada. El análisis por cromatografía en capa delgada demostró que los tubos 20 60-90 contenían lincomicina B, los tubos 91-100 contenían una mezcla de lincomicina y lincomicina B, y los tubos 101-160 contenían

309611 20 FEB



-12-

1796

lincomicina solamente. Los tubos 60-90 fueron primero concentrados y luego secados por congelación; rendimiento de lincomicina B, 960 mg.

C. Cromatografía con Florisil

5

La lincomicina B (800 mg) se disolvió en 30 ml de agua y el pH de la solución se ajustó a 10.5. Después de secar por congelación, el producto se usó como un material de partida para la columna de Florisil descrita más abajo. La columna se preparó de la siguiente manera: se agregaron 40 g de Florisil a una columna de vidrio (1 pulgada diámetro interno) conteniendo Skellysolve B (hexanos isómeros) y se dejó asentar bajo presión atmosférica. Se agregó arena de mar sobre la parte superior del lecho adsorbente, y se lavó la columna con dos volúmenes de impregnación de Skellysolve B (volumen de impregnación 70 ml). La lincomicina B secada por con-

10

gelación se disolvió en 20 ml de acetona y se filtró para separar 190 mg de material insoluble. La solución filtrada se agregó a la columna de Florisil y la columna fue sometida a elución gradual primero con Skellysolve B solo, luego con Skellysolve B-acetona en proporciones de 8:2, 6:4, 3:7, 1:9, y finalmente con acetona sola.

15

Las fracciones eluidas fueron analizadas por determinación de sólidos y por cromatografía en capa delgada. Las fracciones 5-18 que se encontró contenían lincomicina B se mezclaron, y los solventes se evaporaron al vacío para dar 340 mg de material amorfo incoloro conteniendo 249 mcg/ml de lincomicina B base libre. Por concentración hasta sequedad las fracciones 19-28 dieron 50 mg de lincomici-

20

25

309611

20 FEB 1968



-13-

1796

na B base libre que contenían 242 mcg/mg.

Ejemplo 2 Clorhidrato de lincomicina B

La base libre de lincomicina B, 100 mg, se disolvió en 0.7 ml de ácido clorhídrico acuoso 1 N. Por adición de etanol, acetona y éter se obtuvo la precipitación de clorhidrato de lincomicina B semicristalina que separó por filtración y se volvió a disolver en 0.3 ml de agua y 10 ml de acetona. Se agregó acetona adicional (20 ml) y 40 ml de éter. La solución que se hizo turbia, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 horas. Se aisló clorhidrato de lincomicina B cristalino incoloro por filtración y se secó; rendimiento 60 mg conteniendo 250 mcg/mg. Las valoraciones se obtuvieron ensayando las preparaciones contra Sarcina lutea en agar amortiguado a pH 6-8 con amortiguador de fosfato pH 7.0 (0.1 M). Un volumen unitario (0.08 ml) de solución conteniendo el material para valorar se coloca en un disco de ensayo de 12.7 mm que es entonces colocado en una placa de agar sembrada con el microorganismo de ensayo.

PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DE LA BASE LIBRE DE LINCOMICINA B

Calculado para $C_{17}H_{32}N_2O_6S \cdot 1/2H_2O$:

C, 50.92; H, 8.30; N, 6.99; S, 8.00; O, 25.84.

Hallado:

C, 50.86; H, 8.48; N, 7.40; S, 8.13; O, 25.13 (por diferencia)

Rotación óptica específica: $[\alpha]_D^{25} + 153^\circ$ (c = 0.8726, agua)

Solubilidad: Soluble en alcoholes inferiores, acetona, acetato de

309611

20 FEB



-14-

1796

etilo, hidrocarburos clorados, y dioxano. Menos soluble en agua, éter y benceno. Relativamente insoluble en solventes hidrocarburos saturados.

Peso Molecular: Hallado: 402 ± 10 , por titulación potenciométrica.

5 Espectro ultravioleta: La base libre de lincomicina B no muestra máxima entre 220 y 400 m μ .

Titulación: pKa' de aproximadamente 7.68.

Espectro infrarrojo:

10

El espectro de absorción infrarrojo de la base libre de lincomicina B en mezcla de Nujol se reproduce en el dibujo, Figura I. La curva superior representa la mezcla de Nujol mientras que la curva inferior representa una suspensión de base libre de lincomicina B en mezcla de Nujol. La base libre de lincomicina B muestra picos máximos en las siguientes longitudes de onda expresadas en cm⁻¹:

15

3340 (F)	1343 (M)	1051 (F)
2920 (F) (Aceite)	1325 (M)	988 (M)
2850 (F) (Aceite)	1305 (M)	945 (M)
2780 (M)	1237 (M)	902 (M)
20 1645 (F)	1215 (M)	863 (M)
1527 (F)	1185 (M)	802 (M)
1457 (F) (Aceite)	1158 (M)	778 (M)
1376 (F) (Aceite)	1078 (F)	720 (M) (Aceite)
		692 (M)

Cromatografía en papel:

25

La base libre de lincomicina B tiene un diseño característico

309611

20 FEB 1963



1796

en la cromatografía en papel, según se muestra en el dibujo de la Figura II. Los sistemas solventes empleados fueron los siguientes:

- I 1-butanol, agua (84:16); 16 horas.
- 5 II 1-butanol, agua (84:16) más 0.25% de ácido p-tolueno-sulfónico; 16 horas.
- III 1-butanol, ácido acético, agua (2:1:1); 16 horas.
- IV Piperidina al 2% (v/v) n-butanol, agua (84:16); 16 horas.
- 10 V 1-butanol, agua (4:96); 5 horas.
- VI 1-butanol, agua (4:96) más 0.25% de ácido p-toluenosulfónico; 5 horas.

PROPIEDADES QUIMICAS Y FISICAS DE CLORHIDRATO DE LINCOMICINA B

Calculado para $C_{17}H_{32}N_2SO_6 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$

15 Hallado: C, 46.77; H, 8.03; N, 6.36; S, 7.46; Cl, 7.98, O, 23.40 (por diferencia).

Rotación óptica específica: $[\alpha]_D^{25} + 147.5^\circ$ (c, 1, agua)

Solubilidad:

Soluble en alcoholes inferiores.

20 Ligeramente soluble en solventes menos polares.

Relativamente insoluble en éter, benceno, hidrocarburo clorado y solventes hidrocarburos saturados.

Peso molecular: 446.5 (calc.)

Espectro ultravioleta:

25 El clorhidrato de lincomicina B no muestra máxima entre -



309611 20 FEB 1965

220 y 400 μ .

Espectro infrarrojo:

5

El espectro de absorción infrarrojo de clorhidrato de lincomicina B en mezcla con Nujol se representa en el dibujo de la Figura III. La curva superior representa la mezcla de Nujol mientras que la curva inferior representa una suspensión de clorhidrato de lincomicina B en mezcla con Nujol. El clorhidrato de lincomicina B muestra picos máximos en las siguientes longitudes de onda, expresadas en cm^{-1} :

10

3470 (inflex.)	1580 (M)	1100 (F)
3360 (F)	1305 (D)	1085 (F)
3240 (F)	1270 (D)	1050 (F)
3180 (F)	1235 (D)	980 (M)
3090 (M)	1205 (D)	905 (D)
1690 (F)	1160 (D)	875 (M)
1680 (F)	1145 (D)	795 (M)
1590 (M)	1125 (D)	

15

20

Las intensidades de banda, según se indican en el espectro infrarrojo anterior se indican por las letras "F", "M" y "D". Son aproximadamente en términos del fondo del espectro en la vecindad de bandas, una banda "F" es del mismo orden de intensidad que la banda más fuerte en el espectro; las bandas "M" y "D" respectivamente, están entre $1/3$ y $2/3$ de la intensidad de la banda más fuerte y menos de $1/3$ de la intensidad de la banda más fuerte. Estos cálculos estimados se hacen en base a una escala de por ciento de transmisión.

25



Actividad in vivo:

Ratones infectados con S. aureus. tratados oralmente fueron protegidos con una dosis terapéutica media de 13.9 (5. 1-22.3) - mg/kg de clorhidrato de lincomicina B.

5

N O T A.-

=====

10

La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

15

1.- Procedimiento para la preparación de lincomicina B, caracterizado porque comprende cultivar Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas hasta que una actividad substancial sea impartida a dicho medio por la producción de lincomicina y lincomicina B, separando la lincomicina B de la lincomicina y aislando la lincomicina B.

20

2.- Procedimiento, caracterizado porque comprende cultivar Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis en un medio nutritivo acuoso conteniendo 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 y lincomicina B, separando la lincomicina B de la lincomicina y aislando la lincomicina B.

25

3.- Procedimiento, de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque la separación consiste en some-

309611

20 FEB



- 18 -

ter una mezcla de lincomicina y lincomicina B a la extracción fraccionada de líquido-líquido usando un sistema solvente constituido por volúmenes iguales de 1-butanol y agua.

5 4.- Procedimiento, caracterizado porque comprende cultivar un organismo productor de lincomicina en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas hasta que una actividad substancial sea impartida a dicho medio por la producción de lincomicina y lincomicina B, separando lincomicina B de la lincomicina y aislando la lincomicina B.

10 5.- Procedimiento para la preparación de lincomicina B.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva y se ilustra con los planos que a la misma se acompañan.

15 Consta dicha memoria de diez y ocho hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 20 Febrero 1.965.

CARLOS ROE
S.A.

309611

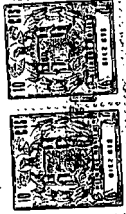


FIGURA I

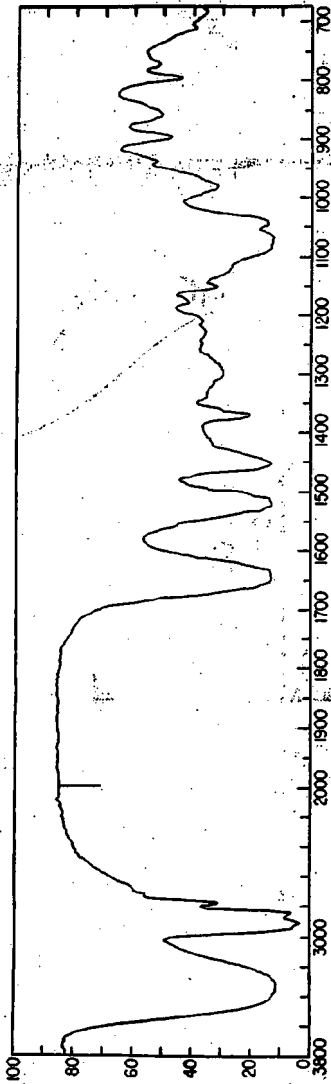


FIGURA III

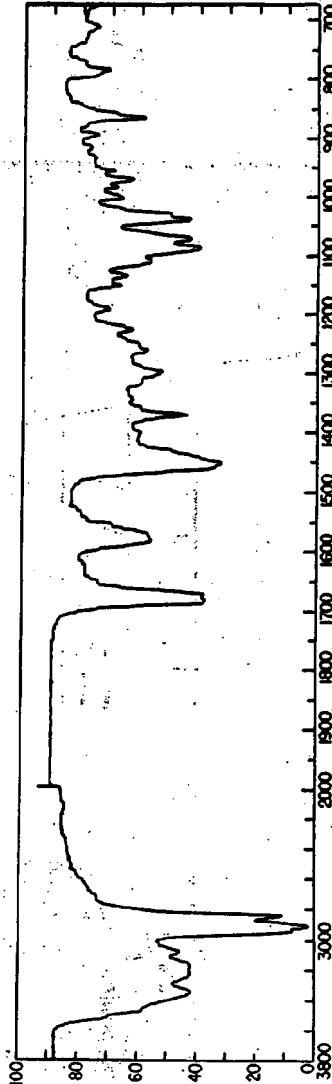
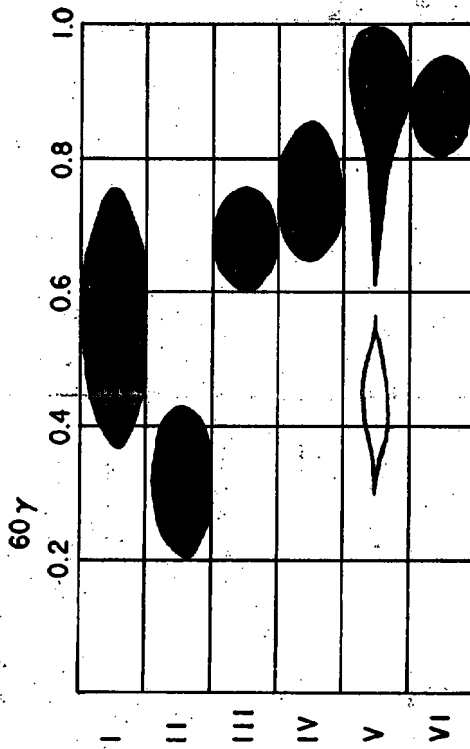


FIGURA II



ESCALA VARIABLE

1971 DEC 30 PM