

19



313098

MEMORIA DESCRIPTIVA

para

Una Patente de Invención,
por veinte años en España,

a favor de

THE UPJOHN COMPANY
(sociedad norteamericana)

residente en

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

por:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LINCOMICINA D"

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

PRIORIDAD: Solicitud Patente EE.UU. Serial nº 371.047 del día 28 de Mayo de 1.964.



Esta invención se refiere a una nueva composición de materia y a un proceso para la preparación de la misma. Esta invención se refiere más particularmente a un nuevo compuesto, lincomicina D (U-11,973 E), y a un proceso para la producción del mismo.

5

Lincomicina D es un producto biosintético producido por un actinomiceto productor de lincomicina cuando se agrega metil - tiolincosaminida (MTL) a la fermentación descrita en Ejemplo 1 de Patente E.U.A. 3,086,912 para la producción de lincolnensina, también llamada lincomicina. MTL se obtiene por hidrazinólisis de -- lincomicina.

10

Lincomicina D es un compuesto básico y tiene el mismo espectro antibacteriano que lincomicina. Por lo tanto, puede utilizarse de la misma manera que lincomicina. Por ejemplo, es útil en soluciones de lavado, con propósitos sanitarios, como en el lavado de las manos y limpieza del equipo, pisos o muebles de habitaciones contaminadas; es también útil como un preservativo industrial, por ejemplo, como un enjuague bacteriostático para ropas lavadas y para papel y telas de impregnación; y es útil para suprimir el crecimiento de organismos sensibles en ensayos en placa, y otros medios biológicos. También puede ser usada como un suplemento alimenticio, para promover el crecimiento de mamíferos y aves, ya sea sola o en combinación con otros antibióticos.

15

20

25

Lincomicina y Lincomicina D son similares en algunos aspectos, tales como que ambos antibióticos tienen un grupo titulable básico con valores pKa similares y pesos equivalentes muy aproximados;



5 y ambos antibióticos no muestran ninguna absorción en la región ultravioleta. Sin embargo, se puede comprobar que son diferentes compuestos como se demuestra por sus solubilidades en varios solventes, rotación óptica, espectro de absorción infrarroja y cromatografía - en capa delgada usando un sistema solvente constituido por metil --

10 El nuevo compuesto de la invención puede producirse en -- una fermentación como se describe en Ejemplo 1, Patente E.U.A. --- 3,086,912 cuando se usa una cantidad efectiva de metil tiolincosaminida (MTL) que oscila entre más que impurezas casuales o 0.75 gm/litro hasta 8 gm/litro del medio de fermentación. El MTL puede estar en el medio inicialmente, o puede introducirse en el cultivo durante la fermentación. La alimentación puede hacerse continuamente, semi-continuamente o por otros medios mientras que la concentración de MTL en el medio de fermentación no afecte el crecimiento del microorganismo hasta el punto en que sufra la producción de lincomicina D. Preferentemente, la alimentación se comienza cuando la fermentación es de 24 a 48 horas de antigüedad. El nivel tóxico de -

15 MTL puede variar con el equipo y medio utilizados, pero en general no es tóxico un nivel, en ningún momento determinado durante la fermentación, de menos de aproximadamente 3 gm/litro del medio de fermentación. Por lo tanto, un programa de alimentación para MTL puede usarse por medio del cual el nivel de MTL en la fermentación no sea nunca mayor de 3 gm/litro en cualquier momento determinado. A

20 medida que este nivel aumenta, y nuevamente dependiendo del equipo

25



5 y medio utilizados, pueden observarse algunas manifestaciones de --
toxicidad, tales como reducción del crecimiento miceliano. Cuando
el crecimiento de micelio ha descendido significativamente por los
agregados de MTL, entonces, generalmente, puede observarse una nota
ble disminución en el rendimiento de la fermentación de lincomicina
D. MTL no se considera ser un aditivo de fermentación extremadamente
tóxico en el sentido como, por ejemplo, lo es el ácido fenilacético
para la fermentación de la penicilina. Por lo tanto, aún si se agre
gan 8 gm/litro de MTL dentro de la fermentación de una vez, todavía
se producirá lincomicina D en la fermentación.

10 El nuevo compuesto de la invención es una base nitrogenada
que tiene la fórmula molecular $C_{17}H_{32}N_2O_6S.HCl.H_2O$. Es monobásica,
tiene un pKa de aproximadamente 7.6, y bajo condiciones ordinarias -
es más estable en la forma protonada, esto es, en la forma sal. Es
15 soluble en agua, alcoholes inferiores, por ejemplo, metanol, etanol,
y semejantes; y relativamente insoluble en ésteres alquílicos infe
riores de ácidos alcanoicos inferiores, por ejemplo, acetato de eti
lo, acetato de butilo, acetato de amilo, y semejantes; alcanonas in
feriores, por ejemplo, acetona, metil etil cetona, isopropil butil -
20 cetona, y semejantes; y alcanos inferiores clorados, por ejemplo, --
cloruro de metileno, cloroformo, dicloruro de etileno, y semejantes.
Es insoluble en éter y benceno.

25 Cuando se agrega metil tiolincosaminida (MTL) a una fer
mentación de lincomicina tal como se revela en Patente E.U.A. ---
3,086,912, se produce lincomicina D y algo de lincomicina.



Un método preferido para la recuperación de lincomicina D es la --
utilización de adsorbentes tensioactivos, por ejemplo, carbón deco
lorante, o resinas decolorantes, y elución del material adsorbido
por medio de un solvente. Cualquiera de los solventes mencionados
5 más arriba puede utilizarse. Una resina decolorante adecuada es -
Permutit DR (Patente E.U.A. 2,702,263). El fermentado total se --
filtra como se indica en Patente E.U.A. 3,086,912 antes del pasaje
del fermentado sobre el adsorbente tensioactivo. Los eluidos son
evaporados hasta sequedad y el residuo es extraído con un solvente
10 no miscible en agua del cual se recupera el nuevo compuesto y lin-
comicina. Si se desea, ambos antibióticos pueden convertirse en la
forma protonatada. Procedimientos posteriores son necesarios para
conseguir una separación de lincomicina y lincomicina D. Esto pue-
de realizarse, convenientemente, por repetidas extracciones a un pH
15 alcalino de una solución conteniendo los dos antibióticos. Un sol-
vente para lincomicina, por ejemplo, un alcano inferior clorado, tal
como cloruro de metileno, puede utilizarse. Estos extractos con sol
vente contienen en forma predominante lincomicina. La solución acuo
sa remanente, que contiene principalmente lincomicina D con trazas -
20 de lincomicina, puede extraerse ventajosamente en forma repetida con
un solvente para lincomicina D, por ejemplo, un alcohol inferior no
miscible en agua, tal como alcohol n-butílico. Los extractos con sol
vente pueden someterse a posteriores procedimientos de purificación,
por ejemplo, distribución en contracorriente, cromatografía de parti
25 ción sobre sílica o tierra de diatomeas, ventajosamente, usando --



mezclas de solventes para lincomicina D, como se indica anteriormente, y agua como agentes de elución, cromatografía de adsorción o adsorbentes adecuados, por ejemplo, Florisil (un silicato sintético - del tipo descrito en Patente E.U.A. 2,393,625 y vendido por la Flo-
5 ridin Company), alúmina, y carbón con elución de la lincomicina D de ellos, ventajosamente, con solventes para lincomicina D, como se menciona anteriormente.

La extracción fraccionada líquido-líquido se lleva a cabo en columnas de partición cromatográfica o en un aparato de distribución en contracorriente usando sistemas de solventes tales como --
10 alcohol n-butílico y agua (1:1).

La cristalización de lincomicina D puede llevarse a cabo, convenientemente, disolviendo una preparación de sal purificada de lincomicina D en agua y agregando una alcanona inferior, por ejemplo,
15 acetona.

La recristalización se lleva a cabo disolviendo la sal -- cristalina en agua, agregando un solvente miscible en agua, por ejemplo, acetona, metanol, etanol, o 2-propanol, y enfriando para inducir o completar la cristalización. Los cristales se filtran y lavan
20 con solventes acuosos, y, si se desea, por solvente anhidro y luego secado al vacío.

El nuevo compuesto de la invención puede también recuperarse del líquido de fermentación filtrado por adsorción sobre resinas de intercambio catiónico. Pueden utilizarse ambos tipos de
25 ácido carboxílico y sulfónico. [Las resinas de ácido carboxílico

119 MAYO



-7-

313098

1900

5 adecuadas incluyen las resinas de ácido poliacrílico obtenidas por la copolimerización de ácido acrílico y divinilbenceno por el procedimiento señalado en página 87 de Kunin, Resinas de Intercambio Iónico, Segunda Edición, (1958), John Wiley & Sons, Inc. Las resinas de intercambio catiónico de ácido carboxílico de este tipo son comercializadas bajo los nombres registrados Amberlite IRC-50 y Zeo-
10 karb 226. Las resinas de ácido sulfónico adecuadas incluyen resinas de poliestireno de núcleo sulfonado con ligaduras entrecruzadas con divinilbenceno que se obtienen por el procedimiento indicado en pá-
15 gina 84 de Kunin, supra. Las resinas de intercambio catiónico sulfonadas de este tipo son comercializadas bajo los nombres registrados Dowex 50, Amberlite IR-120, Nalcite HCR, Chempro C-20, Permutit Q, y Zeokarb 225.]

15 El antibiótico es eluido de la resina con un ácido, ventajosamente 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 a un pH de aproximadamente 7.5 a 8.5 con una base, por ejemplo, hidróxido de sodio, o una resina de intercambio aniónico fuertemente básica. [Las resinas de intercam-
20 bio aniónico adecuadas para este propósito se obtienen por clorometilación por el procedimiento indicado en páginas 88 y 97 de Kunin, supra, de poliestireno con ligaduras cruzadas, si se desea, con divinil-
25 benceno, preparado por el procedimiento indicado en página 84 de Kunin, supra, y cuaternando con trimetilamina o dimetiletanolamina por el procedimiento indicado en página 97 de Kunin, supra. Las resinas



19 M

313098

-8-

1900

de intercambio aniónico de este tipo son comercializadas bajo los nombres registrados Dowex 2, Dowex 20, Amberlite IRA-400, Duolite A-102, y Permutit S-1.]

5

El nuevo compuesto de la invención puede purificarse por sucesivas transferencias de las formas protonadas a no protonadas y vice versa, especialmente haciendo intervenir otros tipos de tratamientos, como por ejemplo, extracciones y lavados con solventes, cromatografía y extracciones fraccionadas líquido-líquido. De esta manera pueden emplearse las sales de lincomicina D 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 antibiótico por tratamiento por álcali. O el antibiótico puede convertirse en una sal hidrosoluble, tal como el clorhidrato o sulfato, y la solución acuosa de la sal extraerse con varios solventes no miscibles en agua antes de regenerar la base libre del antibiótico por tratamiento con álcali de la solución ácida así extraída.

10

15

Las sales de lincomicina D pueden utilizarse para los mismos propósitos biológicos que la base libre o pueden emplearse para mejorar el antibiótico como se describe anteriormente.

20

Pueden hacerse sales de ácido específicas por neutralización de la base libre con un ácido apropiado hasta por debajo de -- aproximadamente pH 7.0, y ventajosamente entre pH 2 y pH 6 aproximadamente. Los ácidos adecuados para este propósito incluyen ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, succínico, cítrico, --

25



5

láctico, maleico, fumárico, pamoico, cólico, palmítico, múcico, --
canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, es-
teárico, salicílico, 3-fenilsalicílico, 5-fenilsalicílico, 3-metil-
glutárico, ortosulfobenzoico, ciclohexanosulfámico, ciclopentanopro-
piónico, 1,2-ciclohexanodicarboxílico, 4-ciclohexenocarboxílico, oc-
tadecenilsuccínico, octenilsuccínico, metanosulfónico, bencenosul-
fónico, heliántico, de Reinecke, dimetilditlocarbámico, sórbico, -
monocloroacético, undecilénico, 4'-hidroxiazobenceno-4-sulfónico,
octadecilsulfúrico; pícrico, benzoico, cinnámico, y ácidos semejan-
tes.

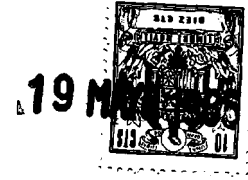
10

15

La lincomicina D puede utilizarse en laboratorios de hos-
pital para aislar Klebsiella pneumoniae de las torundas de algodón
o exudados orgánicos de pacientes en los cuales están presentes can-
tidades mezcladas de ciertos otros microorganismos, tales como Ba-
cillus subtilis y Staphylococcus aureus. Estos últimos organismos
son relativamente susceptibles a la lincomicina D, mientras que la
K. pneumoniae es relativamente resistente, y cuando una concentración
apropiada de lincomicina D se encuentra presente en el medio, de-
sarrollará K. pneumoniae, mientras que no lo harán B. subtilis o S.
aureus. El nuevo compuesto también puede usarse para inhibir los
gérmenes grampositivos formadores de esporos que se difunden sobre
placas de agar cuando se aíslan mohos, levaduras, actinomicetos y -
organismos gramnegativos. Puede ser usado, por ejemplo, en el ais-
lamiento de microorganismos en muestras de suelo como también en el
aislamiento de organismos gramnegativos, por ejemplo, Pseudomonas,

20

25



313098

Proteus y Escherichia coli de infecciones mixtas en presencia de -
Estafilococos o Estreptococos.

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

Ejemplo 1 Lincomicina D

A. Fermentación

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

- 15 Yeastolac* 10 gm
- Glucosa Monohidratada 10 gm
- N-Z Amina B** 5 gm
- Agua corriente c.s.p. 1 litro

*Yeastolac es un hidrolizado proteico de células de le-
vadura.

20 **N-Z Amina B es un digerido enzimático de caseína
Sheffield.

25 El medio de presiembrado después de la esterilización tenía
un pH 7.3. La presiembrado se cultivó durante 2 días a 28° C en un -
agitador rotativo Gump operando a 250 rpm con un desplazamiento osci-
latorio de 2-1/2 pulgadas.



El inóculo de presiembra (600 ml), descrito anteriormente, se usó para inocular un tanque de siembra de 400 litros conteniendo 250 litros del siguiente medio de siembra estéril:

	Glucosa Monohidratada	10 gm
5	Levadura	10 gm
	Productos de destilación solubles	5 gm
	Cloruro de sodio	4 gm
	Agua corriente c.s.p.	1 litro

10 Ajustar pH a 7-7.2 con una solución al 50% de hidróxido de sodio, luego agregar un gramo/litro de CaCO₃ y 2 ml/litro de aceite de manteca de cerdo. Esterilizar durante 30 minutos a 121° C.

El inóculo de siembra se desarrolló durante 48 horas a una temperatura de 28° C, con una proporción de aireación de 100 litros standard/minuto, y agitando a razón de 280 rpm.

15 Un inóculo de 5% de la siembra descrita anteriormente -- (12.5 litros) se usó para inocular un tanque de fermentación de 400 litros conteniendo 250 litros del siguiente medio de fermentación - estéril:

	Glucosa monohidratada	15 gm
20	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
25	Aceite de manteca de cerdo	5 ml



Ucon** 2 ml
Agua corriente c.s.p. 1 litro

*El Licor de Peptona Wilson No. 159 es una preparación de hidrolizado enzimático de proteínas de origen animal.

5 **Un polialquileno glicol sintético producido por Union Carbide Chemical Co., N.Y. 17, N.Y.

Antes de la esterilización, el pH se ajustó a 7.2 con una solución al 50% de hidróxido de sodio.

Se agregaron dos gramos/litro de MTL dentro de la fermentación anterior a las 48 horas. (En fermentaciones similares, se agregaron niveles de MTL tan altos como de 8 gramos/litro para producir lincomicina D.)

25 El cultivo se desarrolló durante 90 horas a una temperatura de 28° C, proporción de aireación de 200 litros standard por minuto, y agitando a razón de 280 rpm. Todo el caldo de precolección tenía una valoración contra S. lutea de 204 mcg/mg.

20 La valoración contra Sarcina lutea se conduce sobre agar amortiguado a pH 6-8 con solución amortiguadora fosfato pH 7.0 -- (0.1 M). Un volumen unitario (0.08 ml) de solución conteniendo el material a ser valorado 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.

B. Recuperación

25 Se filtró todo el caldo (35 litros) de una fermentación de lincomicina D al pH de recolección usando 4% de tierra de diatomas como coadyuvante de filtración. El filtrado se mezcló --

313098

19 MAR 1955

1900



5 durante 30 minutos con 5% de carbón activado y luego se filtró --
usando 5% de tierra de diatomeas como un coadyuvante de filtración.
El conglomerado de carbón se lavó sucesivamente con agua y acetona
acuosa al 20%, luego se eluyó una vez con acetona acuosa al 70%, y
dos veces con acetona acuosa al 90%. Los tres eluidos de acetona -
(uno de 70% y dos de 90%) se mezclaron, se concentraron hasta lí-
quido acuoso y se secaron por congelación para dar 121.7 g de pre-
paración No. 1 que contenía lincomicina y lincomicina D. El con-
glomerado de carbón que quedó después de las extracciones con ace-
10 tona se suspendió con n-butanol, acetona, y agua (3:3:2) y se fil-
tró. El líquido madre se concentró hasta un líquido acuoso y se -
secó por congelación para dar 9 gramos de preparación No. 2 que --
contenía lincomicina y lincomicina D. Partes de preparaciones 1 y
2, 112 y 6 gramos, respectivamente, se mezclaron y disolvieron en
15 400 ml de agua. El pH de la solución se ajustó hasta 10 por el --
agregado de 11 ml de hidróxido de sodio acuoso 5 N. Esta solución
se extrajo entonces con 500 ml de Skellysolve B (hexanos isómeros),
y se descartó el extracto. La solución acuosa remanente (425 ml)
fue entonces extraída 4 veces con porciones de 250 ml de cloruro de
20 metileno. Los extractos de cloruro de metileno mezclados (950 ml)
se concentraron hasta sequedad para dar 4.5 gm de preparación A que
contenía solamente lincomicina. La solución acuosa usada se extra-
jo cinco veces con porciones de 250 ml de alcohol n-butílico. Los
extractos de butanol mezclados se lavaron con agua y luego se con-
25 centraron hasta una solución acuosa y se secaron por congelación.



Esta preparación entonces se disolvió en una solución conteniendo 20 ml de metanol absoluto y 29 ml de cloruro de hidrógeno metanólico 1 N. Esta solución se mezcló con 500 ml de éter etílico y el precipitado que se formó se aisló por filtración y se disolvió en agua. La solución acuosa se secó por congelación hasta un residuo, preparación B, que contenía lincomicina y lincomicina D.

C. Distribución en Contracorriente

La preparación B se disolvió en 100 ml de la fase inferior de un sistema de solventes compuesto por volúmenes iguales de alcohol n-bútilico y agua. La solución 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 (10 ml por fase), todo de vidrio. Después de 930 transferencias se analizó la distribución por determinación de sólidos y cromatografía en capa delgada. El análisis por cromatografía en capa delgada demostró que los tubos 104-170 contenían principalmente lincomicina D. El contenido de estos tubos se mezcló y se concentró al vacío, (aproximadamente 80 ml) momento en que precipitó el clorhidrato de lincomicina D cristalino (200 mg). El filtrado se concentró luego a un volumen de 50 ml y el clorhidrato de lincomicina D cristalino adicional que precipitó se aisló por filtración; rendimiento 200 mg. Estas dos preparaciones cristalinas impuras se mezclaron (400 mg) y se disolvieron en 17 ml de agua. Por el agregado de 60 ml de acetona a esta solución, precipitó clorhidrato de lincomicina D cristalino de alta pureza bajo forma de cristales plumosos largos incoloros.



313098

Los cristales se aislaron por filtración y se secaron; rendimiento 170 mg.

La metil tiolincosaminida usada en Ejemplo 1 se preparó de la manera siguiente:

- 5 Una solución de 4 g de lincomicina en 20 ml de hidrato de hidrazina (98-100%) se reflujo durante 21 horas. El exceso de hidrato de hidrazina se destiló al vacío bajo nitrógeno, mientras se calentaba sobre un baño de vapor, para dejar una masa pastosa de -- cristales. La masa se enfrió, se agregó acetonitrilo, y la mezcla
- 10 se revolvió hasta que la pasta se dispersó y se suspendieron los -- cristales. Los cristales se recolectaron, se lavaron con acetoni-trilo y con éter. El rendimiento de metil tiolincosaminida cristalina blanca después de secar al vacío a temperatura ambiente fue -- 2.1 g (84%). La recristalización fue llevada a cabo disolviendo la
- 15 substancia en dimetilformamida caliente y agregando un volumen igual de etilen glicol dimetil éter.

CARACTERIZACION DE CLORHIDRATO DE LINCOMICINA D

Espectro de Absorción U.V.: El clorhidrato de lincomicina

20 D no presenta ninguna absorción máxima en la zona de -- 220-400 m μ .

Titulación: La titulación potenciométrica muestra la presencia de un grupo básico titulable con un pK'a de 7.6.

Solubilidad: El clorhidrato de lincomicina D es soluble en agua, alcoholes inferiores, por ejemplo, metanol, -

25 etanol, y semejantes. Es relativamente insoluble en -

5

alcanonas inferiores, por ejemplo, acetona, metil etil cetona, isopropil n-butil cetona, y semejantes; ésteres alquílicos inferiores de ácidos alcanóicos inferiores, por ejemplo, acetato de etilo, acetato de n-butilo, acetato de amilo, y semejantes; alcanos inferiores clorados, por ejemplo, cloruro de metileno, cloroformo, dicloruro de etileno y semejantes; éter, y benceno.

Peso Molecular: Hallado 450 ± 20 (por titulación potenciométrica).

10

Cromatograma en Papel: El trazado cromatográfico en papel de clorhidrato de lincomicina D en los siguientes sistemas de solventes es como se muestra en FIGURA 1 del dibujo:

15

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

20

Aspecto Cristalino: Agujas blancas.

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{25} = +149^\circ$ (c, 0.923, agua).

Análisis Elemental: Calculado para $C_{17}H_{32}N_2O_6S.HCl.H_2O$
 C, 45.73; H, 7.90; N, 6.28; S, 7.18; Cl, 7.94;
 O, 25.08.

25



Hallado: C, 45.62; H, 7.78; N, 6.23; S, 7.31; Cl, 7.82;
O, 25.24 (por diferencia).

Espectro de Absorción Infrarrojo: El espectro de absorción infrarrojo en cm^{-1} , de clorhidrato de lincomicina D en mezcla con aceite mineral, como se representa en el dibujo de FIGURA II es como sigue:

5

10

15

3570 (D)	1308 (D)	1005 (D)
3478 (D)	1277 (D)	990 (M-D)
3305 (D)	1240 (D)	980 (M-D)
3220 (D)	1201 (D)	875 (M)
3050 (D)	1155 (M-D)	804 (M-D)
1687 (F)	1108 (M)	755 (D)
1668 (F)	1090 (M-D)	720 (D)
1596 (F)	1067 (D)	700 (D)
1350 (D)	1050 (M)	

20

Las intensidades de banda en el espectro infrarrojo anterior se indican con las letras "F", "M", y "D" respectivamente, y son aproximadas en términos del fondo del espectro en la vecindad de las bandas. Una banda "F" es del mismo orden de intensidad que la banda más fuerte en el espectro; las bandas "M" están entre $1/3$ y $2/3$ de la intensidad de la banda más fuerte, y las bandas "D" están por debajo de $1/3$ de la intensidad de la banda más fuerte.

19 MAR



- 18 -

313098

N O T A.-

=====

La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

5 1.- Procedimiento para la preparación de lincomicina D, que consiste en cultivar Streptomyces lincolnensis var. Lincolnensis en un medio nutritivo acuoso conteniendo metil tiolincosaminida en una cantidad efectiva que oscila entre más de impurezas casuales hasta 8 gm/litro de medio nutritivo acuoso, bajo condiciones aeróbicas hasta que una actividad substancial sea impartida a dicho medio por producción de lincomicina D.

10 2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste en aislar la lincomicina D así producida.

15 3.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el medio nutritivo acuoso contiene metil tiolincosaminida en una cantidad efectiva que oscila entre más de impurezas casuales de 0.25 gm/litro hasta 8 gm/litro del medio nutritivo acuoso.

20 4.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el cultivo se efectúa a una temperatura de aproximadamente 18° C hasta aproximadamente 37°C durante un período de unos 2 a 10 días.

25 5.- Procedimiento que consiste en cultivar Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis en un medio nutritivo acuoso que contiene metil tiolincosaminida, en una cantidad efectiva que oscila entre más de impurezas casuales de 0.25 gm/litro hasta 8 gm/litro de un medio nutritivo acuoso, una fuente de carbohidra-



313098

to asimilable y de nitrógeno asimilable bajo condiciones aeré-
bicas hasta que una actividad substancial sea impartida a
dicho medio por la producción de lincomicina D.

5 6.- Procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 5, que consiste en aislar la lincomicina D así produci-
da.

7.- Procedimiento que consiste en cultivar
Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis en un medio nutri-
tivo acuoso al que se agregan 2 gm/litro de metil tiolincosa-
minida, bajo condiciones aeróbicas hasta que una actividad
10 substancial sea impartida a dicho medio por la producción de
lincomicina D.

8.- Procedimiento que consiste en cultivar
Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis en un medio nutri-
tivo acuoso al que se agregan 2 gm/litro de metil tiolincosa-
minida, una fuente de carbohidrato asimilable y de nitrógeno
15 asimilable bajo condiciones aeróbicas hasta que una actividad
substancial sea impartida a dicho medio por la producción de
lincomicina D.

20 9.- Procedimiento de acuerdo con la reivindica-
ción 7, que consiste en aislar lincomicina D así producida.

10.- Procedimiento de acuerdo con la reivindi-
cación 8 que consiste en aislar la lincomicina D así producida.

25 11.- Procedimiento para la preparación de linco-
micina D.

Según se describe y reivindica en la presente
memoria descriptiva, la cual consta de diecinueve hojas folia-
das y escritas a máquina por una sola cara, y dibujos adjuntos.

Madrid, a 9 MAYO 1965
CARLOS ROEB

313098

313098



FIGURA 1

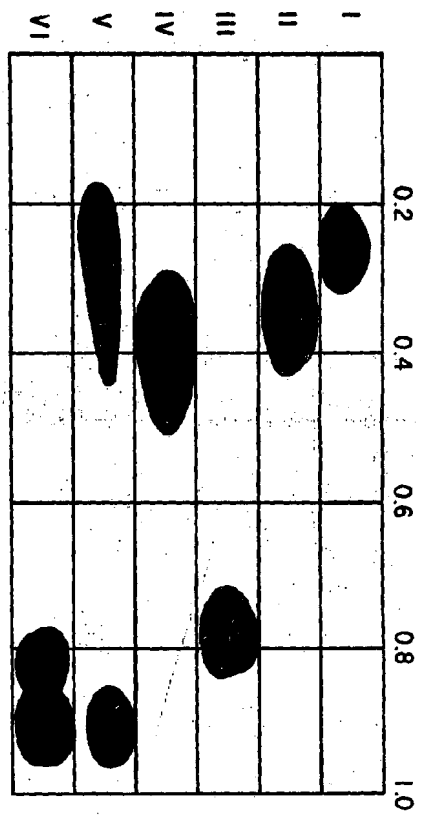
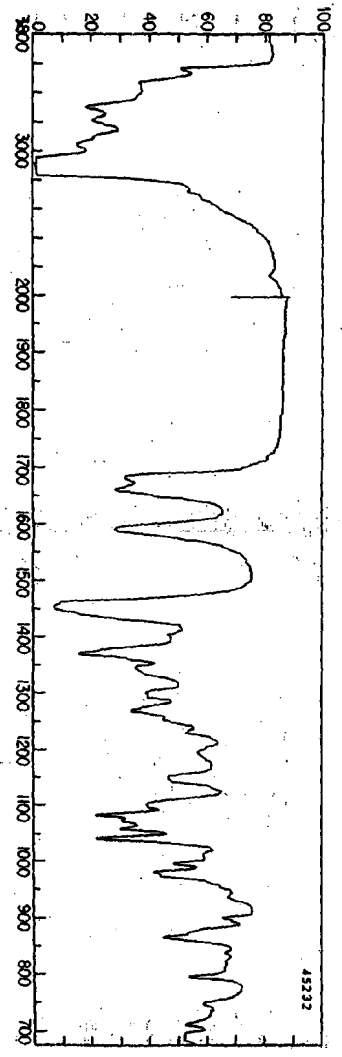


FIGURA 2



ESPIA UNICA