

341895



341895

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION  
DE LINCOMICINA S"

PROPIETARIA: THE UPJOHN COMPANY, Sociedad de  
nacionalidad norteamericana, con  
residencia en los E.U.A.

INVENTORES: DONALD JOSEPH MASON, de nacionali-  
dad norteamericana, con residen-  
cia en los E.U.A.

ALEXANDER DEMETRIOS ARGOUELIS, de  
nacionalidad Griega, con residen-  
cia en los E.U.A.

.....

16 JUN 1960  
2201

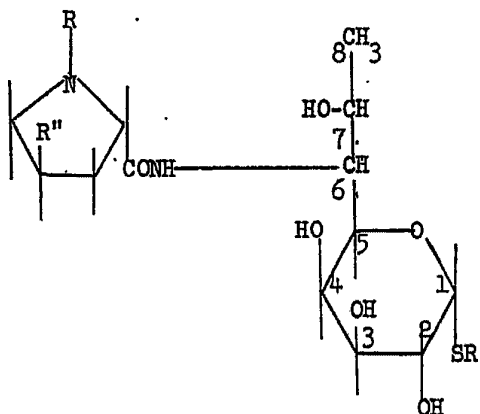


# 341895

Esta invención se refiere a una nueva composición de la materia y a un proceso para la producción de la misma. Más particularmente, esta invención se refiere a un nuevo compuesto, N-demetil-N-etil-lincomicina C, llamado también lincomicina S (U-25,468) y a un proceso para la producción de la misma.

La lincomicina S es un compuesto orgánico que se produce cultivando una actinomiceta productora de lincomicina en un medio nutritivo acuoso en presencia de etionina agregada en condiciones aeróbicas. La lincomicina S tiene la siguiente fórmula estructural:

10



15

en donde R y R' son etilo y R'' es n-propilo.

20

La lincomicina S es un compuesto básico que tiene la propiedad de actuar adversamente sobre el desarrollo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, por ejemplo, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Streptococcus faecalis, Streptococcus hemolyticus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Salmonella schottmuelleri. Por lo tanto la lincomicina S puede ser usada sola o en combinación con otros agentes antibióticos para prevenir el desarrollo o reducir el número -

25



341895

de bacterias, en diversos ambientes, como se reveló más arriba. Por ejemplo, puede ser usado como desinfectante en diversos equipos dentales y médicos contaminados con Staphylococcus aureus. Es también útil en soluciones de lavados para usos sanitarios, como el lavado de manos y la limpieza de equipos, pisos, muebles de cuartos o laboratorios contaminados; es también útil como preservativo industrial, por ejemplo, como enjuague bacteriostático para ropa lavada y para impregnación de papel y telas; y es útil para detener el crecimiento de organismos sensibles en ensayos en placas y otros medios microbiológicos.

5

10

Según esta invención la actinomiceta usada para la producción de lincomicina S es Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis. Esta es una actinomiceta bien conocida que está en depósito en la colección permanente del Northern Utilization and Research Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, U.S.A. El número de registro en esta colección es NRRL 2936.

15

20

La lincomicina S está relacionada por su estructura a los antibióticos lincomicina, lincomicina B (U-21,699) y lincomicina C (U-11,921). En relación a la Fórmula I, las estructuras son como sigue:

25

	R	R'	R''
Lincomicina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Lincomicina B	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Lincomicina C	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Lincomicina S	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>



2201

-4-

341895

La lincomicina S, no obstante su relación a la lincomicina, lincomicina B y lincomicina C, es un antibiótico claramente diferente poseyendo propiedades antibacterianas inesperadas. La lincomicina, lincomicina B y lincomicina C tienen actividad antibacteriana frente a organismos Gram-positivos, mientras que la lincomicina S es activa - no sólo frente a organismos Gram-positivos sino que también frente a organismos Gram-negativos. La siguiente Tabla I muestra la comparación de lincomicina y lincomicina S frente a microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos comunes.

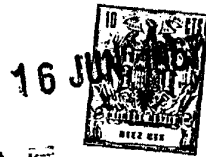
10

TABLA I

<u>ORGANISMOS DE PRUEBA</u>	<u>CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA EN MCG./ML.</u>	
	<u>LINCOMICINA</u>	<u>LINCOMICINA S</u>
<u>S. aureus</u>	0.8	0.4
<u>Streptococcus hemolyticus</u>	0.4	0.4
15 <u>Streptococcus faecalis</u>	0.4	0.4
<u>E. Coli</u>	> 200	50
<u>K. pneumoniae</u>	50	12.5
<u>S. schottmuelleri</u>	> 200	50

20

Se ha encontrado ahora que al agregar etionina a la fermentación usando el microorganismo Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis, no sólo se produce lincomicina C y algo de lincomicina y lincomicina B, sino que también se produce lincomicina S. Hasta nuestro descubrimiento, los procedimientos acostumbrados y usuales para aislar la lincomicina, lincomicina B y lincomicina C del caldo de cultivo



2201

-5-

341895

que contiene a los mismos, han destruído o impedido aislar y reconocer la lincomicina S. En el proceso de dichos caldos, fueron aislados la lincomicina, lincomicina B y lincomicina C y se descartaron los residuos. Así, a pesar de formarse lincomicina S en forma concomitante a la lincomicina, lincomicina B y lincomicina C, ella no fue conocida, reconocida o recuperada en una forma utilizable y reconocible anterior a esta invención. Por el procedimiento de esta invención somos capaces ahora de aislar, separar y recuperar lincomicina S libre de lincomicina, lincomicina B, lincomicina C y semejantes.

Aunque la lincomicina S puede ser producida por fermentación, como se describió en Ejemplo 1 de Patente E.U.A. 3,086,912, cuando se agrega etionina, la producción de lincomicina S en esta fermentación no es suficiente para una recuperación eficaz. Un medio preferido para la producción de lincomicina S es un medio sintético de fermentación, como se muestra en Ejemplo 1, al cual se agrega etionina. En este medio la fuente del carbono es la glucosa monohidratada y la fuente del nitrógeno es el nitrato de amonio. Trazas de metales tales como zinc, hierro y magnesio son agregadas al medio. Aunque el actual medio preferido produce la mayor cantidad recuperable de lincomicina S, se reconoce que pueden llevarse a cabo variaciones en el medio en una forma bien conocida para expertos en el oficio, pudiéndose usar otras fuentes de carbono y nitrógeno. Tales otras fuentes de carbono pueden ser azúcar moreno, sacarosa, glicerina, almidón, almidón de maíz, galactosa, dextrina, melazas y similares. Otras fuentes de nitrógeno pueden ser el licor macerado de -



5 maíz, levadura, levadura de cerveza autolizada sin sólidos, harina de soja, harina de semillas de algodón, harina de maíz, sólidos de la leche, digerido pancreático de caseína, destilados solubles, harina de pescado, licor de peptona animal, residuos de carne y hueso y similares.

10 La producción de lincomicina S puede efectuarse a cualquier temperatura útil para el desarrollo satisfactorio de microorganismos, por ejemplo, entre unos 18° y 40° C y preferentemente entre unos 25° y 30° C. Ordinariamente la producción óptima del compuesto es obtenida entre 2 a 10 días aproximadamente. Normalmente el medio permanece bastante cercano del punto neutro, o en el lado básico durante la fermentación. El pH final depende, en parte, de los amortiguadores presentes, si hay alguno, y en parte del pH inicial del medio de cultivo el cual es ajustado ventajosamente a pH 15 6-8 aproximadamente antes de su esterilización.

20 Cuando el crecimiento se lleva a cabo en vasijas grandes y tanques, es preferible usar el microorganismo para inoculación en la forma vegetativa, en vez de la forma esporulada, para evitar un retardo pronunciado en la producción del nuevo compuesto y la ineficaz utilización concomitante de equipo. En efecto, es deseable producir un inóculo vegetativo en un caldo de cultivo nutritivo, - inoculando el caldo de cultivo con una alícuota de cultivo de suelo o agar inclinado. Cuando un inóculo joven vegetativamente activo ha sido así logrado, es transferido asépticamente a grandes vasijas 25 o tanques. El medio en que es producido el inóculo vegetativo puede

341895

10 JUN

2201



ser el mismo o diferente del utilizado para la producción del nuevo compuesto, siempre y cuando sea obtenido un buen crecimiento del microorganismo.

5 En una fermentación de preferencia para lincomicina S, se agregan aproximadamente 500 mg./litro de etionina a la fermentación al final de 72 horas. Cualquier cantidad mayor o menor, digamos de unos 0.5 mg./ml a unos 4 mg./ml, que sea eficaz para la producción de lincomicina S, puede ser usada. La fermentación es entonces cosechada a los 6 días. Puede usarse ya sea DL-etionina o L-etionina, 10 pero la adición de L-etionina resulta más efectiva en la producción de lincomicina S. Cualquiera que sea la etionina usada, puede presentarse un cierto grado de toxicidad al desarrollo del microorganismo que puede reducir la producción final de lincomicina S en la fermentación. La toxicidad puede llevarse al mínimo alimentando la fermentación con etionina cuando ya tiene unas 48 a 72 horas. La alimentación 15 puede ser hecha en forma continua, semicontinua o de otro modo, siempre que la concentración de etionina en la fermentación no afecte el crecimiento del microorganismo hasta el punto donde la producción de lincomicina se resienta.

20 Pueden emplearse una variedad de procedimientos en el aislamiento y purificación de lincomicina S, por ejemplo, extracción por solventes, distribución líquido-líquido en un aparato de Craig, el uso de adsorbentes y cristalización de solventes. En un procedimiento de preferencia, el fermentado total de la fermentación de lincomicina S 25 es filtrado usando un coadyuvante de filtración, por ejemplo, tierra

16 JUN 1967



-8-

341895

220.

de diatomeas, según se requiera. El filtrado es entonces ajustado a un pH alcalino de aproximadamente 10.0 y extraído con un solvente no miscible en agua. Se prefiere el cloruro de metileno. El solvente de extracción es concentrado hasta sequedad para producir una preparación seca impura, conteniendo lincomicina, lincomicina B, lincomicina C y lincomicina S. La lincomicina S puede ser separada de las otras lincomicinas por columna cromatográfica usando un sistema de solventes en los cuales la lincomicina S es soluble para eluir lincomicina S de la columna. En un método preferido la preparación impura conteniendo lincomicina S y otras lincomicinas es pasada sobre una columna cromatográfica de sílica gel. La columna es eluída con un sistema solvente consistente de metil etil cetona:acetona:agua en la proporción de 100:30:5. La lincomicina S es eluída primero de dicha columna. Así, la columna puede ser eluída y las fracciones recogidas y analizadas por cromatografía en capa delgada para detectar la presencia de lincomicina S. La cromatografía en capa delgada es conducida sobre planchas de Sílica gel G (E. Merck A.G. Darmstadt) de 0.12 a 0.5 mm. de espesor usando metil etil cetona:acetona:agua (140:40:22 v/v) como solvente de elución. Las fracciones conteniendo sólo lincomicina S pueden ser mezcladas para su posterior proceso. Las fracciones que contienen lincomicina S y otras lincomicinas pueden ser mezcladas y pasadas a través de la columna por segunda vez. Cuando las fracciones contienen lincomicina S y otras lincomicinas, es ventajoso "enriquecer" esas fracciones en su contenido en lincomicina S exponiéndola a la distribución en contra corriente en un aparato de Craig usando



un sistema solvente que consiste en volúmenes iguales de l-butanol y agua. Esas fracciones enriquecidas de la distribución en contra corriente pueden pasarse entonces a través de una columna cromatográfica como se indicó anteriormente.

5 Alternativamente, preparaciones impuras de lincomicina S que contienen otras lincomicinas, pueden ser expuestas a distribución en contra corriente en un aparato de Craig, como se indicó anteriormente, antes del primer pasaje sobre la columna cromatográfica. Este procedimiento es empleado ventajosamente cuando la preparación impura de lincomicina S contiene una cantidad relativamente  
10 elevada de otras lincomicinas.

Aunque la cromatografía preferida para aislar la lincomicina S de otros materiales conteniendo lincomicina S y otras lincomicinas, es la cromatografía a través de sílica gel, está en el ámbito de esta invención el de que otros procedimientos cromatográficos pueden usarse, como partición cromatográfica y adsorción cromatográfica.  
15

La cristalización, lo mismo que la recristalización del clorhidrato de lincomicina S se consigue disolviendo una preparación de antibiótico consistente de clorhidrato de lincomicina S en agua, agregando un solvente miscible en agua, por ejemplo, acetona, metanol, etanol, o 2-propanol y entonces enfriar para inducir o completar la cristalización. Los cristales son filtrados y lavados con solvente acuoso y si se desea, con solvente anhidro y luego secados al vacío.  
20  
25

16 JUN.



-10-

2201

341895

El nuevo compuesto de esta invención puede ser también recuperado del fermentado filtrado por adsorción en resinas de intercambio catiónico. Pueden ser usadas ambas el tipo ácido carboxílico y el tipo ácido sulfónico. [Resinas de ácido carboxílico apropiadas incluyen resinas de ácido poliacrílico obtenidas por la copolimerización de ácido acrílico y divinilbenceno según el procedimiento expuesto en la página 87 de Kunin, Ion Exchange Resins, 2nd Edition, (1958) John Wiley and Sons, Inc. Resinas de intercambio catiónico de ácido carboxílico de este tipo son comercializadas con la marca de fábrica Amberlite IRC-50 y Zeokarb 226. Resinas de ácido sulfónico apropiadas, incluyen resinas sulfonadas de poliestireno nuclear unidas en cadena cruzada con divinilbenceno que son obtenidas por el procedimiento expuesto en página 84 de Kunin, supra. Este tipo de resinas de intercambio catiónico sulfonados son comercializadas con las marcas de fábrica Dowex-50, Amberlite IR-120, Nalcite HCR, Chempro C-20, Permutit Q y Zeokarb 225.]

El antibiótico es eluido de la resina con un ácido, ventajosamente a un pH inferior que el  $pK_a$  de la resina de intercambio catiónico usada. Resultados satisfactorios son obtenidos con un pH de alrededor de 1 a 6. El eluido es ajustado a pH 7.5 a 8.5 con una base, por ejemplo, hidróxido de sodio, o con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica. Los eluidos pueden ser purificados luego por columna cromatográfica y procedimientos de distribución en contracorriente como se expresó anteriormente. [Resinas de intercambio aniónico adecuadas para este propósito son obtenidas clorometilando según el proce-

341895



5 dimiento dado en páginas 88 y 97 de Kunin, supra, si se desea, poliestireno unido en cadena cruzada con divinilbenceno preparado por el procedimiento dado en página 84 de Kunin, supra y cuaternando con trimetilamina o dimetiletanolamina por el procedimiento dado en página 97 de Kunin, supra. Resinas de intercambio aniónico de este tipo se comercializan bajo las marcas de fábrica Dowex-2, - - Dowex-20, Amberlite IRA-400, Duolite A-102 y Permutit S-1.]

10 Variedad de sales por adición de ácido pueden obtenerse de la lincomicina S al neutralizar la base libre con el ácido apropiado por debajo de alrededor de pH 7.0 y ventajosamente de pH 2 a pH 6, aproximadamente. Ácidos apropiados para este propósito incluyen el clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, succínico, cítrico, láctico, maléico, fumárico, pamóico, cólico, palmítico, mícico, camfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, 3-fenilsalicílico, 5-fenilsalicílico, 3-metilglutárico, ortosulfobenzóico, ciclohexanosulfámico, ciclopentano-  
15 propiónico, 1,2-ciclohexanodicarboxílico, 4-ciclohexenocarboxílico, octadecenilsuccínico, octenilsuccínico, metanosulfónico, bencenosulfónico, heliántico, de Reinecke, dimetilditiocarbámico, sórbico, monocloroacético, undecilénico, 4'-hidroxiazobenceno-4-sulfónico,  
20 octadecilsulfúrico, pícrico, benzóico, cinnámico y ácidos similares.

25 Las sales de lincomicina S pueden usarse para los mismos propósitos biológicos que la base libre o pueden ser empleados para mejorar el antibiótico por trasposos sucesivos del antibiótico de la forma protonada a no protonada y vice versa, especialmente con



16 JUN 1967

2201

-12-

341895

5 otros tipos de tratamiento interviniendo por ejemplo, extracciones con solvente y lavados, cromatografía y extracciones fraccionadas líquido-líquido. Por ejemplo, el antibiótico se puede transformar en una sal insoluble, tal como el picrato que puede someterse a -  
5 procedimientos de purificación y entonces regenerar el antibiótico como base libre por tratamiento con álcali. O el antibiótico puede ser transformado en una sal hidrosoluble como clorhidrato o sulfato y la solución acuosa de la sal extraerla con varios solventes no -  
10 miscibles en agua antes de regenerar el antibiótico como base libre por tratamiento con álcali de la solución ácida así extraída.

La lincomicina S puede ser usada para controlar el S.aureus en utensilios de cocina lavados y apilados. Puede ser usado también como desinfectante en diversos equipos dentales y médicos contaminados con S. aureus. La lincomicina S es activa contra el Bacillus  
15 subtilis y puede ser usada para el tratamiento de prevención o aminorar infecciones en criaderos de gusanos de seda causadas por este microorganismo. Puede usarse también para aminorar o prevenir el -  
olor ocasionado por este microorganismo en pescado y cestos para -  
20 pescado.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos del proceso y -  
los productos de la presente invención, pero no deben considerarse como límite. Todos los porcentajes son en peso y todas las mezclas de solventes son en volumen a no ser que se indique lo contrario.

EJEMPLO 1- LINCOMICINA S



FERMENTACION

Un cultivo de suelo de Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis, NRRL 2936, es utilizado para inocular una serie de matraces Erlenmeyer de 500 ml que contienen cada uno 100 ml de medio de

5 siembra conteniendo los ingredientes siguientes:

Yeastolac *	10 g
Glucosa monohidratada	10 g
N-Z-Amina B **	5 g
Agua corriente c.s.p.	1 litro

10 \* Yeastolac es un hidrolizado de proteína de células de levadura.

\*\* N-Z-Amina B es Digerido Enzimático de Caseína Sheffield.

El pH del medio de siembra posterior a la esterilización, es de pH alrededor de 7.3. La siembra es cultivada durante 2 días a 28° C en un agitador rotatorio Gump que trabaja a 250 rpm con una  
15 oscilación de 2-1/2 pulgadas.

Se agrega un inóculo de 5% de la siembra descrita anteriormente (5 ml) a cada uno de los matraces Erlenmeyer de 500 ml de una serie conteniendo cada uno 100 ml del medio fermentativo siguiente.

20	Glucosa monohidratada	30	g/litro
	Citrato de sodio	3	g/litro
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001	g/litro
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001	g/litro
	MgSO <sub>4</sub>	1	g/litro
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	g/litro
25	NaCl	0.5	g/litro



16 JUL

2201

-14-

341895

$\text{NH}_4\text{NO}_3$

2.0 g/litro

Agua deionizada c.s.p.

1 litro

5 La glucosa monohidratada y el citrato de sodio se esterilizan por separado de las sales. La zona de pH del medio de fermentación posterior a su esterilización es de 7.3 a 7.8. Los matracos de fermentación inoculados son colocados en un agitador rotatorio Gump que opera a 250 rpm con una oscilación de 2.5 pulgadas. El agitador está en una incubadora mantenida a la temperatura de 28° C. Después de un tiempo de fermentación de 72 horas, se agrega asépticamente 10 500 mg/litro de DL-etionina a los matracos de fermentación. Los matracos de fermentación son cosechados a los 6 días.

De una manera similar, se pueden efectuar fermentaciones con L-etionina sustituyendo a la DL-etionina.

#### RECUPERACION

15 El fermentado entero de una fermentación de lincomicina S como se describió anteriormente es filtrado al pH de cosecha usando un coadyuvante de filtración, por ejemplo, tierra de diatomea, según se requiera. El residuo miceliano es lavado con agua y el residuo sólido es entonces descartado. El filtrado del fermentado y el agua 20 de lavado se mezclan y se ajusta a un pH de 10.0 con solución de hidróxido de sodio al 50% y se extrae entonces tres veces con un cuarto de su volumen por vez de cloruro de metileno. Los extractos de cloruro de metileno se combinan y se concentran hasta obtener un aceite.

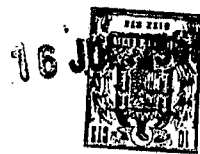


PURIFICACION CROMATOGRAFICA

Una preparación oleosa conteniendo lincomicina S, según se expuso anteriormente, es disuelta en cloruro de hidrógeno metanólico a un pH de aproximadamente 2.0. Al agregar esta solución a éter, se forma un precipitado. Este precipitado, formado por lincomicina, lincomicina B, lincomicina C y lincomicina S, es aislado por filtración. Esta preparación es entonces agregada a una columna cromatográfica de sílica gel que es preparada como sigue:

Se vierte sílica gel (Merck-Darmstadt No. 7734, 0.05-0.20 mm) por una columna de vidrio (6.5 centímetros DI) y se permite asentar a presión atmosférica. La preparación conteniendo lincomicina S, descrita anteriormente, se disuelve en metanol absoluto. Esta solución se mezcla con sílica gel para formar una suspensión y la mezcla se seca al vacío por unas 20 horas. El material es agregado en la cima de la columna de sílica gel. Se agrega entonces sílica gel sobre este lecho y la columna es eluída con un sistema solvente compuesto de metil etil cetona:acetona:agua (100:30:5).

Las fracciones conteniendo solamente lincomicina S son eluídas de la columna antes que las otras lincomicinas. La presencia de lincomicina S es determinada por cromatografía en capa delgada, según lo expuesto anteriormente. Estas fracciones conteniendo únicamente lincomicina S son recogidas y concentradas a sequedad. El residuo es disuelto en cloruro de hidrógeno metanólico 1 N a un pH de 2.0



aproximadamente. Esta solución es concentrada de vuelta a sequedad. El residuo es disuelto en metanol absoluto y esta solución es mezclada con éter. Mientras la mezcla se va concentrando lentamente en un evaporador rotatorio, cristaliza un material incoloro identificado como lincomicina S por cromatografía en capa delgada. Estos cristales son separados por filtración y secados. Lincomicina S cristalina adicional es recuperada del filtrado de la cristalización anterior por concentración del filtrado a sequedad. El residuo es disuelto en metanol absoluto y esta solución es mezclada con éter etílico. Se revuelve la mezcla durante aproximadamente 4 horas. Los cristales de lincomicina S que se forman se separan por filtración y se secan.

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL CLORHIDRATO DE LINCOMICINA S

El clorhidrato de lincomicina S cristalino tiene las siguientes propiedades físicas y químicas:

Análisis calculado para:  $C_{20}H_{38}N_2O_6 \cdot S \cdot HCl \cdot H_2O$ : C, 49.12; H, 8.47; O, 22.95; N, 5.74; S, 6.57; Cl, 7.27.

Peso molecular: 488.5 (calculado).

Rotación óptica:  $[\alpha]_D^{25} = +144.5^\circ$  (c, 0.38, agua)

Espectro infrarrojo: El clorhidrato de lincomicina S presenta picos en las siguientes longitudes de onda expresadas en  $cm^{-1}$  cuando se practica en un disco de KBr:



16 JUN 1964

2201

-17-

341895

	3350 (F)	1456 (M)	993 (M)
	3060 (M)	1392 (M)	977 (M)
	2960 (F)	1320 (M)	900 (D)
	2920 (F)	1264 (M)	867 (D)
5	2865 (M)	1210 (D)	801 (M)
	2720 (D)	1143 (M)	750 (D)
	1680 (F)	1095 (F)	707 (D)
	1562 (F)	1077 (F)	675 (M)
	1545 (M)	1048 (F)	

10

El clorhidrato de lincomicina S presenta picos en las siguientes longitudes de onda expresadas en  $\text{cm}^{-1}$  cuando se practica en una suspensión de petrolato:

	3310 (F)	1545 (M)	1095 (F)
15	3060 (M)	1460 (F) (aceite)	1077 (F)
	2950 (F) (aceite)	1378 (F) (aceite)	1049 (F)
	2920 (F) (aceite)	1365 (M)	991 (M)
	2860 (F) (aceite)	1338 (M)	977 (M)
	2850 (F) (aceite)	1300 (M)	900 (D)
20	2720 (M)	1262 (M)	867 (M)
	1683 (F)	1210 (M)	801 (M)
	1567 (M)	1142 (M)	713 (M)
			675 (M)

25

Las intensidades de banda en los espectros infrarrojo anteriores son indicadas como



-18-

341895

2201

5

"F", "M" y "D" respectivamente, y son -  
aproximados en base al fondo del espectro  
en la vecindad de las bandas. Una banda  
"F" es del mismo orden de intensidad que  
la banda más intensa del espectro; las -  
bandas "M" son entre 1/3 y 2/3 de la inten  
sidad de la banda más intensa y las bandas  
"D" son menos de 1/3 de la intensidad de la  
banda más intensa.

10

Solubilidad:

El clorhidrato de lincomicina S es soluble  
en agua y metanol. Es soluble moderadamen  
te en etanol al 95% o etanol absoluto y  
relativamente insoluble en solventes como  
acetona, acetato de etilo, hidrocarburos  
saturados y clorados.

15

PROCEDIMIENTO DE VALORACION ANTIBACTERIANA

20

El espectro antibacteriano para la Tabla I, anteriormente visto,  
fue determinado usando el procedimiento de valoración de dilución en  
tubo con el medio BHI (Brain Heart Infusion Broth, Difco, Detroit,  
Michigan). Los tubos de valoración (18 x 150 mm) fueron preparados en  
la forma acostumbrada como se halla publicado en Snell, E.E. Vitamin  
Methods, Vol I, Academic Press, Inc., New York 150, pág. 327. Los  
organismos de ensayo desarrollados durante 18 horas a 37° C, fueron  
usados para inocular el medio de ensayo. Las valoraciones fueron -  
leídas a las 20 horas.

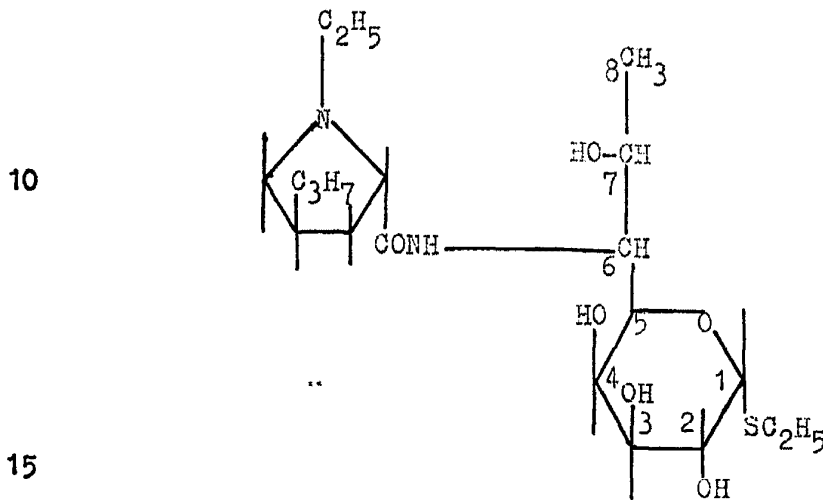
25



N O T A . -

La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

5 1.- Procedimiento para la producción de lincomicina S, que tiene la siguiente fórmula estructural:



20 caracterizado porque consiste en el cultivo de un microorganismo productor de lincomicina en un medio nutritivo acuoso en presencia de etionina agregada en una cantidad eficaz, en condiciones aeróbicas hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de lincomicina S y el aislamiento de la lincomicina S así producido, prácticamente libre de otras lincomicinas.

25 2.- Procedimiento para la producción de lincomicina S, caracterizado porque consiste en el cultivo de Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis en un medio nutritivo acuoso en presencia de etionina agregada en una cantidad eficaz bajo con-



341895

diciones aeróbicas hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de lincomicina S y aislamiento de la lincomicina S así producida, prácticamente libre de otras lincomicinas.

5

3.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, para el aislamiento de lincomicina S en su forma esencialmente pura y prácticamente libre de otras lincomicinas, caracterizado porque consiste en: (a) pasaje de una preparación conteniendo lincomicina S y otras lincomicinas por una columna cromatográfica; (b) elución de la columna cromatográfica con un sistema solvente para lincomicina S y (c) aislamiento de la lincomicina S en su forma esencialmente pura y prácticamente libre de otras lincomicinas de los eluidos de la columna.

10

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque es usada una columna cromatográfica de sílica gel.

15

5.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el solvente de elución consiste de metil etil cetona: acetona: agua en la proporción 100:30:5.

6.- Procedimiento para la preparación de lincomicina S.

20

Según se describe y reivindica en la presente memoria, la cual consta de veinte hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a

16 JUN. 1967

CARLOS ROEB