



332302

M E M O R I A   D E S C R I P T I V A

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:

"UN PROCEDIMIENTO PARA INHIBIR LA FORMACION DE PIRROLIDINAS N-ALQUILADAS  
Y PIRROLIDINAS SUSTITUIDAS, POR MICROORGANISMOS DURANTE UNA FERMENTACION"

- - - - -

INVENTORES: Alexander Demetrios Argoudelis, de nacionalidad griega, y LeRoy  
Emanuel Johnson, Thomas Richard Pyke, ambos de nacionalidad nor-  
teamericana.

- - - - -

PRIORIDAD: Solicitud Patente EE.UU. Serial nº 497.438 del día 18 de Octubre  
de 1965.

- - - - -



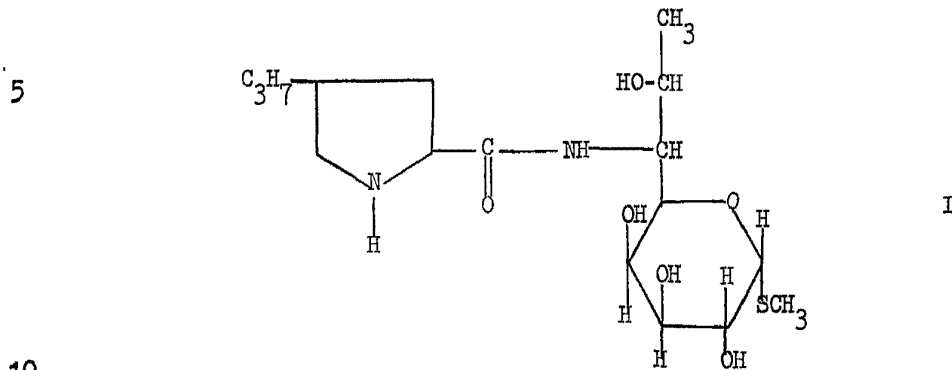
Esta invención se refiere a un nuevo proceso para inhibir la formación de pirrolidinas N-alquiladas y pirrolidinas sustituidas, - por microorganismos durante una fermentación y a nuevos compuestos producidos en el mismo. Más particularmente, esta invención se -  
5 refiere a un nuevo proceso en donde un inhibidor metabólico, seleccionado de la clase compuesta por sulfonamidas hidrosolubles - que poseen propiedades antibacterianas, y reactivos carbonilo que inhiben las ácido glutámico-decarboxilasas, se agrega a una fermentación microbiológica para inhibir la formación de pirrolidinas N-alquiladas y pirrolidinas sustituidas, y a nuevos compuestos producidos por el mismo.  
10

Ilustrativamente, los inhibidores metabólicos que pueden usarse en el nuevo proceso, son los compuestos siguientes y sus sales: sulfanilamida, sulfaguanidina, sulfatiazol, sulfadiazina, N-sulfanilbenzamida, sulfaquinoxolina, sulfabromometazina, N'-acetilsulfanilamida, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfapirazina, sulfapiridina, tiocarbohidrazida, semicarbazida, tiosemicarbazida, hidrazida del ácido furóico, hidrazida del ácido isonicotínico, e hidroxil amina.  
15

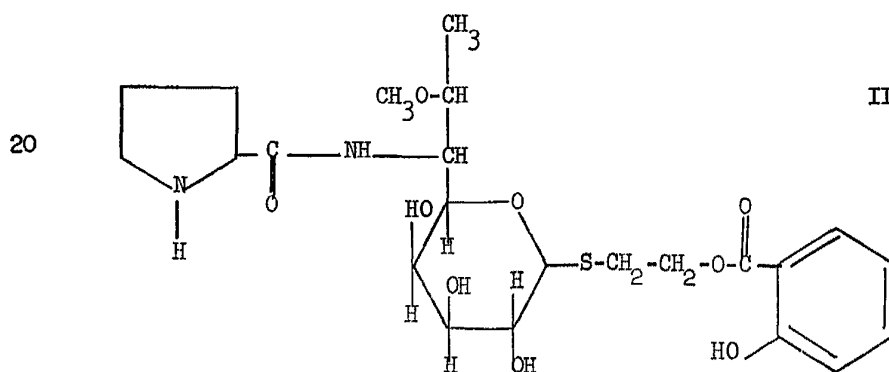
El proceso de la invención en cuestión puede usarse en una fermentación, usando el microorganismo Streptomyces lincol-  
nensis var. lincolnensis que se describe en Patente E.U.A. - - -  
3,086,912 como un productor del antibiótico lincomicina. Cuando se agrega un inhibidor metabólico del proceso en cuestión, al proceso descrito en Ejemplo 1 de Patente E.U.A. 3,086,912, se produce  
25



el antibiótico lincomicina D. Lincomicina D es N-demetillincomicina y puede representarse por la fórmula estructural siguiente:



El proceso de la invención en cuestión puede también -  
 usarse en la fermentación de celesticetina revelada en Ejemplo 3 -  
 de Patente E.U.A. 2,928,844. El producto resultante es el nuevo -  
 compuesto N-demetilcelesticetina que puede representarse por la -  
 15 fórmula estructural siguiente:

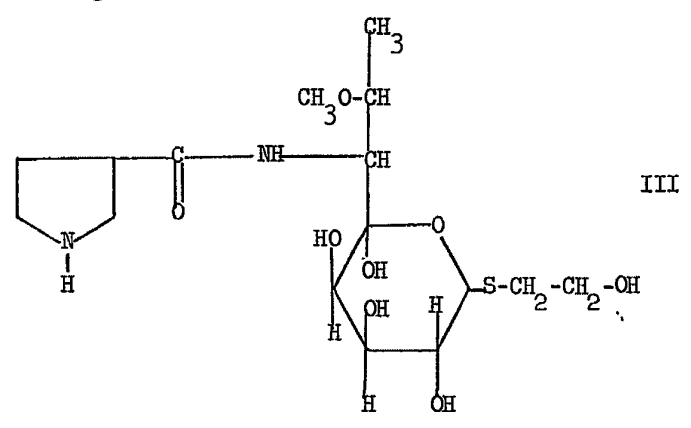




La N-demetilcelesticetina puede ser hidrolizada de acuerdo con el -  
 proceso revelado en Patente E.U.A. 2,851,463 para producir el nuevo  
 compuesto N-demetildesalicetina que puede representarse por la fór-  
 mula estructural siguiente:

5

10



El nuevo proceso de esta invención se practica incorpo--  
 rando en un medio de fermentación una cantidad eficaz de un inhibi-  
 dor metabólico, en proporción que oscila desde más de impurezas -  
 ocasionales de 0.01 g/litro hasta 8 g/litro del medio de fermenta-  
 ción. El inhibidor metabólico puede estar presente inicialmente -  
 en el medio, o puede ser agregado al cultivo durante la fermenta--  
 ción. El agregado puede hacerse en forma continua, semicontinua -  
 o por otros medios siempre que la concentración del inhibidor meta-  
 bólico en el medio de fermentación no afecte al cultivo de micro--  
 organismo hasta el punto en que la producción del producto deseado  
 se resienta. Preferentemente, el agregado se comienza cuando la -  
 fermentación tiene una antigüedad de 24 a 48 horas. El nivel tóxi-  
 co del inhibidor metabólico variará con el microorganismo, equipo,

25



y medio usado, pero en general en cualquier momento particular de la fermentación, una concentración menor de unos 5 g/litro de medio de fermentación no es tóxica. Por lo tanto, puede usarse un programa de alimentación de inhibidor metabólico por el cual el nivel del inhibidor metabólico en la fermentación no sea nunca superior a 5 g/litro en cualquier momento determinado. A medida que se aumenta este nivel, y siempre dependiendo del equipo y medio usado, se pueden observar algunas manifestaciones tóxicas, tales como crecimiento misceliano reducido. Cuando el crecimiento del miscelio está reducido apreciablemente por los agregados del inhibidor metabólico, entonces, generalmente, se observará una caída notable en el rendimiento de la fermentación del producto deseado.

Quando se agrega un inhibidor metabólico, como se delineó previamente, a una fermentación de lincomicina, tal como se revela en Patente E.U.A. 3,086,912, se produce lincomicina D y algo de lincomicina. También, por el agregado de un inhibidor metabólico a la fermentación de celesticetina, como se revela anteriormente, se produce N-demetilcelesticetina y algo de celesticetina. Un método preferido para la recuperación de lincomicina D y N-demetilcelesticetina es el uso de un producto líquido de intercambio catiónico. El primer paso de dicho proceso consiste en poner en contacto el fermentado con un producto líquido de intercambio catiónico no miscible en agua, que consiste de por lo menos un diluyente orgánico no miscible en agua y por lo menos una-



1500

sal de un ácido sulfónico aromático soluble en aceite, teniendo -  
dicho ácido 1 a 2 anillos aromáticos y por lo menos una mitad al-  
quilo, habiendo así en total por lo menos 15 átomos de carbono al-  
quílicos cuando el ácido contiene un anillo aromático y por lo me-  
5 nos 8 átomos de carbono alquílicos cuando el ácido contiene 2 ani-  
llos aromáticos. El segundo paso de dicho proceso consiste en po-  
ner en contacto el producto líquido de intercambio catiónico eluí-  
do, resultante del primer paso, con una mezcla de agua y por lo me-  
nos un agente de extracción seleccionado del grupo constituido por  
10 aminas, sales por adición de ácido hidrosoluble de las mismas y -  
sales de amonio cuaternario hidrosolubles, a un pH menor de aproxi-  
madamente 7. La solución acuosa resultante entonces puede usarse  
directamente como una fuente conveniente del material básico nitro-  
genado, o el material básico nitrogenado puede ser separado de la  
15 solución acuosa en forma de base libre o como una sal por adición  
de ácido por métodos conocidos en la materia.

Como se menciona anteriormente, la sustancia líquida de  
intercambio catiónico no miscible en agua del nuevo proceso de es-  
ta invención, consiste por lo menos de un diluyente orgánico no -  
20 miscible en agua y por lo menos de una sal de un ácido sulfónico -  
aromático soluble en aceite. Un diluyente no miscible en agua es  
uno que forma un sistema líquido de dos fases en contacto con un  
volumen igual de agua. Ejemplos de diluyentes orgánicos no misci-  
bles en agua adecuados son los alcanos, por ejemplo, pentano, hexa-  
25 no, heptano, octano y semejantes, especialmente las mezclas dispo-

15 OCT. 1944



nibles en el comercio de hexanos y heptanos isómeros; cicloalca--  
nos, por ejemplo, ciclohexano, metilciclohexano y semejantes, hi-  
drocarburos aromáticos, por ejemplo, benceno, tolueno, los xilenos,  
los trimetilbencenos, etilbenceno, cimeno, cumeno, tetrahidronaf-  
5 taleno y semejantes, hidrocarburos halogenados, por ejemplo, diclo-  
rometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano,  
1,1,2,2-tetracloroetano, clorobenceno, diclorobencenos y semejan-  
tes; éteres, por ejemplo, éter dietílico, éter diisopropílico y -  
semejantes; ésteres, por ejemplo, acetato de etilo, acetato de bu-  
10 tilo, benzoato de metilo y semejantes; y nitro compuestos, por -  
ejemplo, nitrometano, nitrobenceno y semejantes. Se prefiere es-  
pecialmente diclorometano como un diluyente orgánico. La porción  
cación de la sal de ácido sulfónico soluble en aceite, puede ser  
cualquiera de una gran variedad de cationes metálicos. Cationes  
15 metálicos alcalinos, por ejemplo, sodio, potasio e iones amonio,  
y cationes de metal alcalino térreo, por ejemplo, iones de magne-  
sio, calcio y bario, se prefieren, pero también son adecuados -  
otros cationes metálicos, por ejemplo, iones aluminio, zinc y co-  
bre. La porción anión de la sal de ácido sulfónico soluble en -  
20 aceite puede corresponder a cualquiera de una gran variedad de -  
ácidos sulfónicos aromáticos o mezclas de los mismos. Son ácidos  
sulfónicos preferidos aquellos obtenidos por sulfonación de mono-  
o polialquilbencenos o naftalenos. Tales ácidos sulfónicos y sus  
sales solubles en aceite son bien conocidos para aquellos exper-  
25 tos en la materia y muchos son fácilmente obtenibles de fuentes -



comerciales. Son necesarios más procedimientos para efectuar una separación de lincomicina y lincomicina D en una fermentación de lincomicina y de celesticetina y N-demetilcelesticetina en una fermentación de celesticetina. Esto puede hacerse convenientemente, por extracciones repetidas a un pH alcalino de una solución conteniendo uno de los dos pares de antibióticos. Puede utilizarse un solvente para lincomicina y celesticetina, por ejemplo, un alcano inferior clorado, tal como cloruro de metileno. Estos extractos con solvente contienen principalmente lincomicina o celesticetina. La solución acuosa restante, que contiene predominantemente ya sea lincomicina D con trazas de lincomicina o N-demetilcelesticetina con trazas de celesticetina, pueden extraerse ventajosamente en forma repetida con un solvente para lincomicina D y N-demetilcelesticetina, por ejemplo, un alcohol inferior no miscible en agua, tal como alcohol n-butílico. Los extractos de solvente pueden someterse a nuevos procedimientos de purificación, por ejemplo, distribución en contracorriente, cromatografía de partición sobre sílica o tierra de diatoméas, utilizando ventajosamente solventes para lincomicina D y N-demetilcelesticetina, como se revela anteriormente, y mezclas acuosas como agentes de elución, cromatografía de adsorción sobre adsorbentes adecuados, por ejemplo, Florisil (un silicato sintético del tipo descrito en Patente E.U.A. 2,393,625 y comercializado por la Floridin Company), alúmina y carbón con elución de la lincomicina D o N-demetilcelesticetina de los mismos, ventajosamente con solventes para lincomicina D y N-demetilcelesticetina,



como se menciona anteriormente.

5 La extracción fraccionada líquido-líquido, se lleva a ca-  
bo en columnas cromatográficas de partición o en un aparato para -  
distribución en contra corriente, usando sistemas de solvente tales  
como alcohol n-butílico y agua (1:1).

La cristalización de lincomicina D o N-demetilcelestice-  
tina, puede llevarse a cabo convenientemente, disolviendo una pre-  
paración de sal purificada de cada uno de los compuestos en agua -  
y agregando una alcanona inferior, por ejemplo, acetona.

10 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 con solventes acuosos y, si se desea, por solvente anhidro y  
15 luego se secan al vacío.

Los nuevos compuestos de la invención también pueden re-  
cuperarse del líquido de fermentación filtrado por adsorción sobre  
resinas de intercambio catiónico. Pueden usarse tanto el tipo de  
ácido carboxílico como sulfónico. [Las resinas de ácido carboxíli-  
20 co adecuadas incluyen las resinas de ácido poliacrílico obtenidas  
por la copolimerización de ácido acrílico y divinilbenceno por el  
procedimiento dado en página 87 de Kunin, Ion Exchange Resins, (Re-  
sinas de Intercambio Iónico) 2da. edición, (1958), John Wiley and -  
Sons, Inc. Las resinas de ácido carboxílico de intercambio catióni-  
25 nico de este tipo son comercializadas bajos los nombres de fábrica

15 OCT

2264



Amberlite IRC-50 y Zeokarb 226. Las resinas de ácido sulfónico adecuadas incluyen resinas de poliestireno sulfonato nuclear con ligaduras cruzadas con divinilbenceno que se obtienen por el procedimiento dado en página 84 de Kunin, supra. Las resinas de intercambio -  
5 cationico sulfonadas de este tipo son comercializadas bajo los nombres de fábrica 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, ventajosamente a un pH inferior que el pKa de la resina de intercambio -  
10 cationico usada. Se obtienen resultados satisfactorios con un pH de alrededor de 1 a 6. El eluido se ajusta a un pH de 7.5 a 8.5, -  
aproximadamente, con una base, por ejemplo, hidróxido de sodio, o con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica. [Las re-  
15 sinas de intercambio aniónico adecuadas para este propósito se obtienen por clorometilación por el procedimiento indicado en páginas 88 y 97 de Kunin, supra, del poliestireno con ligaduras cruzadas, -  
si se desea, con divinilbenceno, preparado por el procedimiento indicado en página 84 de Kunin, supra, y cuaternando con trimetilamina o dimetiletanolamina por el procedimiento dado en página 97 de -  
20 Kunin, supra. Las resinas de intercambio aniónico de este tipo se comercializan bajo los nombres de fábrica Dowex 2, Dowex 20, Amberlite IRA-400, Duolite A-102 y Permutit S-1].

Los nuevos compuestos de la invención pueden purificarse

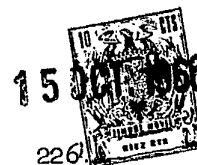


5 por sucesivas transferencias de las formas protonatadas a las formas no protonatadas y vice versa, especialmente con la intervención de otros tipos de tratamientos, como por ejemplo, extracciones y lavados con solvente, cromatografía y extracciones fraccionadas líquido-líquido. De esta manera pueden emplearse sales de lincomicina D y N-demetilcelesticetina para aislar o mejorar el antibiótico respectivo. 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 de antibiótico por tratamiento con álcali. O el antibiótico puede convertirse en una sal soluble en agua, 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 Las sales de lincomicina D, N-demetilcelesticetina, y N-demetildesalicetina pueden usarse para los mismos propósitos biológicos como la base libre. Las sales de lincomicina D y N-demetilcelesticetina pueden usarse para mejorar el antibiótico como se describió anteriormente.

20 Las sales de ácido específicas de los nuevos compuestos de esta invención pueden prepararse por neutralización de la base libre con un ácido apropiado disminuyendo hasta aproximadamente pH 7.0, y ventajosamente hasta aproximadamente pH 2 a pH 6. Los ácidos adecuados para este propósito incluyen ácido clorhídrico

25



sulfúrico, fosfórico, acético, succínico, cítrico, láctico, maléico, fumárico, pamóico, cólico, palmítico, múcico, camfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, 3-fenilsalicílico, 5-fenilsalicílico, 3-metilglutárico, orto--  
5 sulfobenzóico, ciclohexanosulfámico, ciclopentanopropiónico, 1,2--  
ciclohexanodicarboxílico, 4-ciclohexenocarboxílico, octadecenilsuc  
cínico, octenilsuccínico, metanosulfónico. bencenosulfónico, heli  
ántico, de Reinecke, dimetilditiocarbámico, sórbico, monocloroacé  
tico, undecilénico, 4'-hidroxiazobenceno-4-sulfónico, octadecilsul  
10 fúrico, pícrico, benzóico, cinnámico, y semejantes.

La lincomicina D puede usarse en laboratorios de hospita  
les para aislar Klebsiella pneumoniae de muestras o exudados orgá  
nicos de pacientes los cuales presentan mezclas de ciertos otros -  
organismos, tales como Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus.  
15 Los últimos microorganismos son relativamente susceptibles a la -  
lincomicina D, mientras que K. pneumoniae es relativamente resis--  
tente, y cuando en el medio existe una concentración apropiada de  
lincomicina D, se desarrollará K. pneumoniae, mientras que no se -  
desarrollará B. subtilis o S. aureus. El nuevo compuesto también  
20 puede ser usado para inhibir microorganismos gram-positivos forma  
dores de esporos que se propagan en las placas de agar cuando se -  
aislan mohos, levaduras, actinomicetas y microorganismos gram-nega  
tivos. Puede utilizarse, por ejemplo, para el aislamiento de micro  
organismos en muestras de suelo, como también en el aislamiento de  
25 los organismos gram-negativos, por ejemplo, Pseudomonas, Proteus, -

15 OCT

2264



y Escherichia coli de infecciones mezcladas en presencia de Sta--  
phylococcus o Streptococcus.

5 La N-demetilcelesticetina y N-demetildesalicetina pue--  
den usarse para preparar  $\beta$ -hidroxietiltiocelestosaminida ( $\beta$ -HTC)-  
sustituyendo a la celesticetina y desalicetina en Ejemplos 1 y 2, -  
respectivamente, de Patente E.U.A. 3,208,996. La N-demetilceles-  
ticetina y N-demetildesalicetina pueden también usarse para prepa-  
rar análogos antibacterianos activos de la celesticetina y desali-  
10 cetina, cuyos análogos tienen espectros antibacterianos dife-  
rentes de la celesticetina y desalicetina. Por ejemplo, por eti-  
lación de N-demetilcelesticetina y N-demetildesalicetina, se ob--  
tienen compuestos que son activos contra bacterias gram-negativas.

15 Los siguientes ejemplos ilustran el proceso y productos  
de la presente invención, pero no deben interpretarse como los úni-  
cos. Todos los porcentajes están dados en peso y todas las propor-  
ciones de mezclas de solventes están expresadas por volumen, salvo  
que se indique de otra manera.

EJEMPLO 1

A. Fermentación de lincomicina D

20 Un cultivo de tubo inclinado de suelo de Streptomyces Lincol-  
nensis var. lincolnensis, NRRL 2936, se usó para inocular una se-  
rie de frascos Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo cada uno 100 ml.  
de medio de siembra estéril compuesto por los siguientes ingredien-  
tes:



Glucosa monohidratada	25 g
Farmamedia*	25 g
Agua corriente c.s.p.	1 litro

5 \*Farmamedia es una harina de semillas de algodón tipo industrial producida por Trader's Oil Mill Company, Fort Worth, Texas.

El pH antes de la esterilización fue 7.2. La siembra se desarrolló durante tres días a 28° C en un agitador rotatorio Gump operando a 250 rpm con un movimiento de 2-1/2 pulgadas.

10 Se usó un inóculo al 5% de la siembra descrita anteriormente (5.0 ml) para inocular un frasco Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 100 ml de medio de fermentación estéril compuesto por los siguientes ingredientes:

Glucosa monohidratada	15 g
Almidón	40 g
15 Melazas	20 g
Farmamedia	25 g
CaCO <sub>3</sub>	8 g
Agua corriente c.s.p.	1 litro

20 El pH después de la esterilización fue 6.8. Los frascos de fermentación se incubaron a una temperatura de 28° C en un agitador rotatorio Gump, operando a 250 rpm con un movimiento de 2-1/2 pulgadas. Después de 24 horas de fermentación, se agregaron 5 mg de sulfanilamida por ml de medio (0.5 g por 100 ml de medio). El líquido de fermentación se recolectó después de 96 horas de tiempo  
25 de fermentación.

15 OCT



-15-

2264

B. Recuperación

El fermentado total de una serie de fermentaciones de lincomicina D, como se describe anteriormente, se filtró con la ayuda de tierra de diatomeas. El conglomerado del filtro se lavó con - -  
5 agua y el lavado se mezcló con el filtrado. La mezcla de fermentado límpido y lavados (4 litros) se ajustó a pH 6.0 y se extrajo - una vez con 400 ml de una solución al 9% de naftaleno sulfonato de sodio dinonilo (NaDNNS) y Skellysolve B (hexanos isómeros). El fer-  
mentado usado se extrajo entonces una vez con 400 ml de Skellysolve  
10 B. Los extractos de NaDNNS y Skellysolve B se mezclaron. El extrac- to mezclado se lavó con 200 ml de agua. El lavado acuoso se descartó y la fase NaDNNS-Skellysolve B se mezcló con 160 ml de una solu-  
ción al 25% de Aliquat-336 (cloruro de tricaproilo metil amonio de tipo industrial producido por General Mills, Chemical Division, - -  
15 Kankakee, Illinois) en Skellysolve B y 200 ml de agua. La mezcla - se agitó bien y luego se dejó separar las dos fases. La fase acuosa se conservó para procesos posteriores. La fase orgánica se ex-  
trajo dos veces con 200 ml de agua cada vez. Estos extractos acuo-  
sos se mezclaron con el primer extracto acuoso y esta solución acuo-  
20 sa mezclada se lavo dos veces con 200 ml de Skellysolve B cada vez. El lavado de Skellysolve B se descartó. La solución acuosa mezcla-  
da se ajustó a pH 10 y se extrajo tres veces con porciones de - -  
350 ml de cloruro de metileno cada vez. El extracto de cloruro de metileno se concentró hasta sequedad para dar una preparación que -  
25 por cromatografía de papel se encontró contenía compuestos lincomi-

15 OCT



-16-

226-

cina, pero no lincomicina D. La solución acuosa usada se extrajo entonces con n-butanol (cuatro porciones de 350 ml). Los extractos butanólicos se mezclaron y se concentraron hasta sequedad. El residuo se trituró con etanol al 95% y se aislaron por filtración 140 mg de material cristalino insoluble. Esta preparación por cromatografía en papel se encontró contenía principalmente lincomicina D con pequeñas cantidades de los compuestos relacionados de lincomicina. La recristalización de esta preparación disolviendo en 4 ml de agua y agregando 25 ml de acetona, dió 50 mg de una preparación cristalina compuesta de lincomicina D solamente, que tiene el siguiente análisis elemental:

Análisis elemental calculado para:

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

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

#### EJEMPLO 2

La sulfanilamida en Ejemplo 1 puede sustituirse por los siguientes inhibidores metabólicos para producir lincomicina D: sulfaguanidina, sulfatiazol, sulfadiazina, N-sulfanililbenzamida, sulfakinoxolina, sulfabromometazina, N<sup>1</sup>-acetilsulfanilamida, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfapirazina, sulfapiridina, tiocarbhidrazida, semicarbazida, tiosemicarbazida, hidrazida del ácido furóico, hidrazida del ácido isonicotínico, e hidroxilamina.

EJEMPLO 3 N-Demetilcelesticetina.



Agregando un inhibidor metabólico de Ejemplos 1 y 2 a la fermentación del Ejemplo 3 de Patente E.U.A. 2.928.844 de la manera indicada en Ejemplo 1, anterior, se produce N-demetilcelesticetina que puede recuperarse del caldo de fermentación de la manera indicada en Ejemplo 1 para dar N-demetilcelesticenina cristalina que tiene el siguiente análisis elemental:

Análisis calculado para:  $C_{23}H_{34}N_2O_9S$ : C, 53.64; H, 6.65; N, 5.44;  
O, 27.96; S, 6.23.

EJEMPLO 4 N-Demetildesalicetina

Sustituyendo la celesticetina en Ejemplo 1 de Patente E.U.A. 2.851.453 por N-demetibelesticetina, como se obtiene en Ejemplo 3, se obtiene N-demetildesalicetina.

-----  
N O T A.-  
=====

La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

1.- Un procedimiento para inhibir la formación de pirrolidinas N-alquiladas y pirrolidinas sustituidas, por microorganismos durante una fermentación, caracterizado porque consiste en incorporar en el medio de fermentación un inhibidor metabólico seleccionado de la clase constituida por sulfonamidas hidrosolubles que poseen propiedades antibacterianas, y reactivos carbonilo que inhiben las decarboxilasas del ácido glutámico.

2.- Un procedimiento según la reivindicación anterior, caracterizado porque consiste en incorporar en el medio de fermentación un inhibidor metabólico seleccionado de la clase constituida por sulfonamidas hidro-



solubles que poseen propiedades antibacterianas y reactivos carbonilo que inhiben las decarboxilasas del ácido glutámico.

5 3.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en incorporar en el medio de fermentación un inhibidor metabólico seleccionado de la clase constituida por sulfonamidas hidrosolubles que poseen propiedades antibacterianas y reactivos carbonilo que inhiben las decarboxilasas del ácido glutámico, en una cantidad efectiva que oscila desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro del medio nutritivo acuoso.

10 4.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque consiste en incorporar en el medio de fermentación un inhibidor metabólico seleccionado de la clase constituida por sulfonamidas hidrosolubles que poseen propiedades antibacterianas, y reactivos carbonilo que inhiben decarboxilasas del ácido glutámico, en una cantidad efectiva que  
15 oscila desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro de medio nutritivo acuoso.

20 5.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque consiste en incorporar en el medio de fermentación un inhibidor metabólico seleccionado de la clase constituida por sulfonamidas hidrosolubles que poseen propiedades antibacterianas y reactivos carbonilo que inhiben decarboxilasas del ácido glutámico, en una cantidad efectiva que oscila desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro del medio nutritivo acuoso.

25 6.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en cultivar Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis bajo condiciones aeróbicas en un medio nutritivo acuoso que contiene un inhibidor metabólico seleccionado de la clase constituida por sulfo-



namidas hidrosolubles que poseen propiedades antibacterianas y reactivos carbonilo que inhiben las decarboxilasas del ácido glutámico, en una cantidad efectiva que oscila desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro del medio nutritivo acuoso, hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de lincomicina D.

7.- Un procedimiento según la reivindicación nº 6, caracterizado porque consiste en aislar la lincomicina D así producida.

8.- Un procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el inhibidor metabólico es sulfanilamida.

9.- Un procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el medio nutritivo acuoso contiene sulfanilamida en una cantidad efectiva que oscila de desde más de impurezas casuales de 0.01 g/litro hasta 8 g/litro de medio nutritivo acuoso.

10.- Un procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el cultivo se efectúa a una temperatura de aproximadamente 18°C hasta aproximadamente 37°C, durante un período de entre unos 2 hasta unos 10 días.

11.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en cultivar Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis bajo condiciones aeróbicas en un medio nutritivo acuoso al cual se agrega 5 mg de sulfanilamida por ml de medio, después de 24 horas de tiempo de fermentación, hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de lincomicina D.

12.- Un procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque consiste en aislar la lincomicina D así producida.

13.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para inhibir la formación de celesticetina por microorganismos

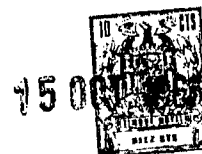


mos durante una fermentación que consiste en incorporar en el medio de fermentación un inhibidor metabólico seleccionado de la clase constituida por sulfonamidas hidrosolubles que poseen propiedades antibacterianas, y reactivos carbonilo que inhiben las decarboxilasas de ácido glutámico, en una cantidad efectiva que oscila desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro de medio nutritivo acuoso.

14.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en cultivar Streptomyces caelestis bajo condiciones aeróbicas en un medio nutritivo acuoso que contiene un inhibidor metabólico seleccionado de la clase constituida por sulfonamidas hidrosolubles que poseen propiedades antibacterianas, y reactivos carbonilo que inhiben las decarboxilasas del ácido glutámico, en una cantidad efectiva que oscila de desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro de medio nutritivo acuoso, hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de N-demetilcelesticetina.

15.- Un procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque consiste en aislar la N-demetilcelesticetina así producida.

16.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque para la producción de N-demetildesalicetina consiste en (1) cultivar Streptomyces caelestis bajo condiciones aeróbicas en un medio nutritivo acuoso que contiene un inhibidor metabólico seleccionado de la clase constituida por sulfonamidas hidrosolubles que poseen propiedades antibacterianas, y reactivos carbonilo que inhiben las decarboxilasas del ácido glutámico, en una cantidad efectiva que oscila de desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro del medio nutritivo acuoso, hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de N-demetilcelesticetina, (2) aislar la N-demetilcelesticetina del medio de fermentación, y (3) hidrolizar la N-demetilcelesticetina a N-demetildesalicetina.



5 17.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en cultivar Streptomyces Lincolnensis var. lincolnensis bajo condiciones aeróbicas en un medio nutritivo acuoso que contiene una sulfonamida hidrosoluble que posee propiedades antibacterianas, en una cantidad efectiva que oscila de desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro del medio nutritivo acuoso, hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de lincomioina D.

10 18.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en cultivar Streptomyces caelestis bajo condiciones aeróbicas en un medio nutritivo acuoso conteniendo una sulfonamida hidrosoluble que posee propiedades antibacterianas, en una cantidad efectiva que oscila de desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro de medio nutritivo acuoso, hasta que una actividad sustancial sea impartida a dicho medio por la producción de N-demetilcelesticetina.

x15 19.- En procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en incorporar en el medio de fermentación una sulfonamida hidrosoluble que posee propiedades antibacterianas, en una cantidad efectiva que oscila desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro de medio nutritivo acuoso.

20 20.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en incorporar en el medio de fermentación una sulfonamida hidrosoluble que posee propiedades antibacterianas.

25 21.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en incorporar en el medio de fermentación una sulfonamida hidrosoluble que posee propiedades antibacterianas, en una cantidad efectiva que oscila de desde más de impurezas casuales hasta 8 g/litro de medio nutritivo acuoso.



22.- Un procedimiento para inhibir la formación de pirrolidinas N-alquiladas y pirrolidinas sustituidas, por microorganismos durante una fermentación.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva.

5

La cual consta de ventidos hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a

15 OCT. 1966

**CARLOS ROEM**