

DE INDUSTRIA  
PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19 ES	21	NUMERO	A1
	21	432.718	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		9-12-1974	

PATENTE DE INVENCION

P.- 59.154  
U.S. 423.257  
-Spain/lh

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
423.257	10-12-73	E.U.A.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	

64 TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO MEJORADO PARA PREPARAR UNA 4(R)-HIDROXI-CICLOPENTANO-1,3-DIONA OPTICAMENTE ACTIVA SUSTITUIDA EN LA POSICION 2"

71 SOLICITANTE (S)
MILMS LABORATORIES, INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
1127 Myrtle Street, Elkhart, Indiana 46514, E.U.A.

72 INVENTOR (ES)
Lung Ting Chang y Carol Ann Terry

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

TGG.

**POOR  
QUALITY**

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la Invención

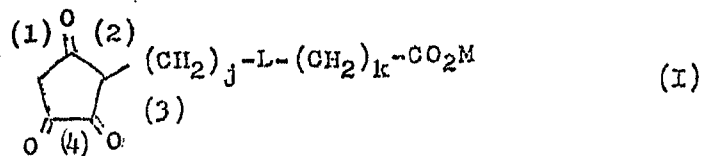
Esta invención se refiere a la preparación de compuestos ópticamente activos que son compuestos inter  
5 medios importantes en la síntesis de prostaglandinas na  
turales, sus análogos y sus derivados.

Descripción de la Técnica Anterior

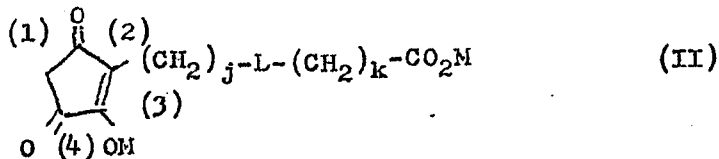
Sih y otros (J. Am. Chem. Soc., 95: 1676 [1973];  
Patente de los EE.UU. Nº 3.773.622 [1973] ) han descrito un  
10 procedimiento para la conversión microbiológica de un subs  
trato de ciclopentano-1,3,4-triona sustituida en la posi  
ción 2 ó un substrato de 3-alcoxi-ciclopent-2-eno-1,4-dio  
na sustituida en la posición 2, en una 4(R)-hidroxi-ciclo  
pentano-1,3-diona sustituida en la posición 2 ópticamente  
15 activa, en la cual el uso del símbolo R con respecto al  
grupo hidroxilo de la posición 4 indica la conformación  
del último de acuerdo con el convenio de Cahn-Ingold-Prelog  
El procedimiento de Sih y otros utiliza un microorganismo  
de la clase Ascomicetos para efectuar la conversión del  
20 substrato.

Un ejemplo específico de este procedimiento in  
cluye la conversión de substratos que tienen las fórmulas  
estructurales generales

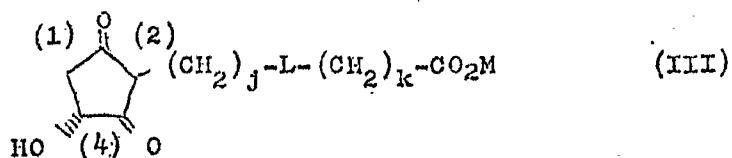
25



y



10 en una 4(R)-hidroxi-ciclopentano-1,3-diona sustituida en la posición 2,



15

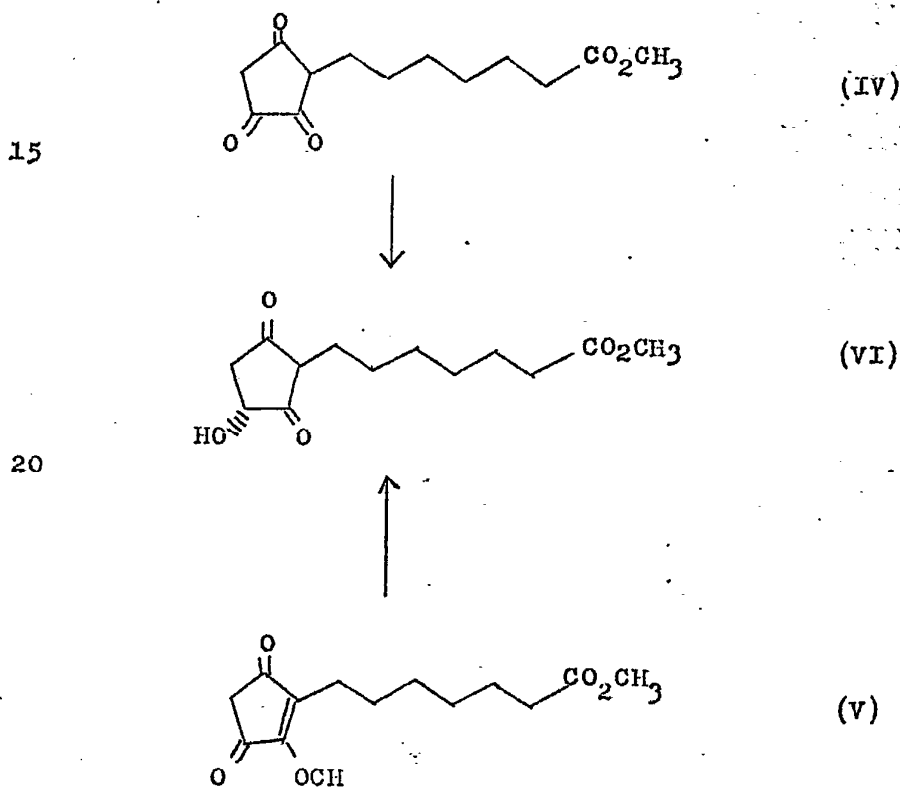
por un microorganismo de los órdenes Endomicetales, Mucorales, Moniliales, o Eurotiales. En las fórmulas I, II y III, L es un radical etileno o vinileno, M es un grupo alcoholo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y j y k son números enteros que tienen un valor comprendido entre 1 y 4. En las fórmulas I, II y III, los átomos de carbono del anillo deciclopentano se numeran en el sentido de las agujas del reloj, como se indica. En la fórmula III, la línea de trazos entre el C<sub>4</sub> del anillo de ciclopentano y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la posición

20

25

4 indica un enlace de valencia que se proyecta por debajo del plano del anillo, exhibiendo así la conformación R según el convenio de Cahn-Ingold-Prelog.

Un ejemplo todavía más específico del procedimiento de Sih y otros es el que se refiere a la con  
5 versión de un substrato tal como 2-(6'-carbometoxihexil)-  
ciclopentano-1,3,4-triona (fórmula IV, abajo) ó 2-(6'-car  
bometoxihexil)-3-metoxiciclopent-2-eno-1,4-diona (fórmula  
V, abajo) en 2-(6'-carbometoxihexil)-4(R)-hidroxiciclopent  
10 tano-1,3-diona (fórmula VI, abajo) por la acción fermen  
tativa de Dipodascus uninucleatus ó Schizosaccharomyces  
pombi:



25

En la fórmula VI, la línea de trazos entre el átomo  $C_4$  del núcleo de ciclopentano y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la posición 4 tiene el mismo significado que se ha definido arriba para la fórmula III.

5 Las condiciones específicas del procedimiento de  $S_{11}$  y otros incluyen las siguientes:

1. La utilización de un medio soja-dextrosa, cerelosa-edmina, o dextrana-licor de maceración de maíz que tiene una concentración inicial de hidratos de carbono comprendida  
10 entre 0,1% y 0,5% y un pH ajustado inicial comprendido entre 5 y 7.

2. La incubación de un microorganismo de la clase Ascomicetos (específicamente de los órdenes Endomicetales, Mucorales, Moniliales, o Eurotiales) en el medio hasta que se  
15 alcanza una concentración del microorganismo de 10%.

3. La adición subsiguiente de una ciclopentano-1,3,4-triona sustituida en la posición 2 ó una 3-alcoxi-ciclopentano-1,4-diona sustituida en la posición 2 al medio a un ritmo de aproximadamente 0,2 gramos por hora y por cada 10 litros  
20 de medio; y,

4. la recuperación de la 4(R)-hidroxi-ciclopentano-1,3-diona sustituida en la posición 2 a partir del medio por extracción con acetato de etilo.

En una operación típica de 72 horas de duración,  
25 se pueden convertir en producto aproximadamente 5 gramos

de sustrato por cada 10 litros de medio.

Significativamente, el procedimiento de Sih y otros no implica mantener la concentración de hidratos de carbono o el pH del medio durante la incubación del microorganismo o la adición de sustrato.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

La materia que constituye el objeto de esta invención es un procedimiento microbiológico mejorado para convertir un sustrato de ciclopentano-1,3,4-triona sustituida en la posición 2 ó un sustrato de 3-alcóxi-ciclopent-2-eno-1,4-diona sustituida en la posición 2 en un producto de 4(R)-hidroxi-ciclopentano-1,3-diona sustituida en la posición 2 ópticamente activa, por la acción de un microorganismo de la clase Ascomicetos, que implica las mejoras siguientes:

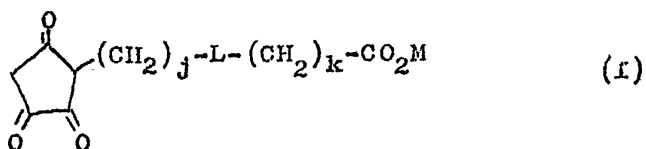
1. Incubar el microorganismo en un medio que tiene una concentración inicial de hidratos de carbono comprendida entre 2% y 6% y un pH inicial comprendido entre 5 y 6, y mantener una concentración de hidratos de carbono subsiguiente comprendida entre 0,1% y 1% y un pH subsiguiente comprendido entre 4 y 5 hasta que se alcanza una concentración del microorganismo comprendida entre 20% y 35%;
2. Añadir el sustrato al medio a un ritmo comprendido entre 0,4 gramos y 1,0 gramos por hora y por cada 10 litros de medio;

3. mantener la concentración subsiguiente de hidratos de carbono del medio entre 0,1% y 1,0% por medio de alimentación por cargas o continua durante la etapa de incubación y la etapa de adición de sustrato; y

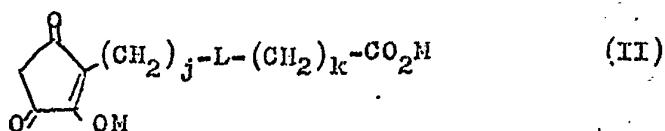
4. mantener el pH subsiguiente del medio entre 4 y 5 durante la etapa de incubación y la etapa de adición de sustrato.

Un ejemplo más específico de esta invención incluye el procedimiento mejorado consistente en convertir

un sustrato que tiene la fórmula estructural

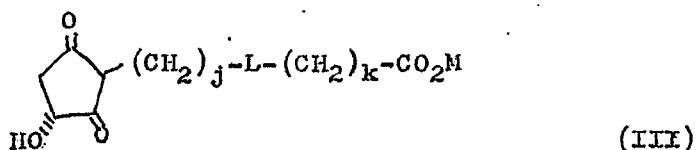


6



a un producto de la fórmula

20



25

donde L es un radical etileno o vinileno, M es un grupo  
alcohilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y j y k  
son números enteros que tienen un valor comprendido en-  
tre 1 y 4. Como se ha descrito previamente, la línea de  
5 trazos entre el átomo de carbono C<sub>4</sub> del núcleo de ciclo-  
pentano y el oxígeno del grupo hidroxilo de la posición  
4 indica un enlace de valencia cuya dirección se proyec-  
ta por debajo del plano del anillo de ciclopentano, re-  
presentándose así gráficamente la conformación R. La con-  
10 versión de los substratos I ó II en el producto III se  
realiza por la acción fermentativa de un microorganismo  
de los órdenes Endomicetales, Mucorales, Moniliales o  
Eurotiales, e incluye las mejoras siguientes:

- 15 1. Incubar el microorganismo en un medio que contiene una  
concentración inicial de glucosa comprendida entre 2% y  
6%, casamino-ácidos, extracto de levadura, y ciertas sa-  
les minerales esenciales, tales como citrato de sodio,  
ortofosfato de dihidrógeno y potasio, nitrato de amonio,  
sulfato de magnesio, y cloruro de calcio, y que tienen  
20 un pH comprendido entre 4 y 5 hasta que se alcanza una  
concentración del microorganismo comprendida entre 20%  
y 35%, y mantener una concentración de glucosa subsiguien-  
te comprendida entre 0,1% y 1% y un pH subsiguiente com-  
prendido entre 4 y 5 en el medio;
- 25 2. añadir subsiguientemente substrato I ó II al medio a

un ritmo comprendido entre 0,4 gramos y 1,0 gramos por hora y por cada 10 litros de medio;

3. mantener la concentración de glucosa subsiguiente del medio entre 0,1% y 1,0% por medio de alimentación por cargas o continua durante las etapas arriba indicadas; y
4. mantener el pH subsiguiente del medio entre 4 y 5 durante las etapas 1 y 2 de este procedimiento.

Un ejemplo detallado de esta invención se refiere al procedimiento mejorado de conversión de un substrato tal como 2-(6'-carbometoxihexil)-ciclopentano-1,3,4-tri-  
ona ó 2-(6'-carbometoxihexil)-3-metoxi-ciclopent-2-eno-1, 4-diona en 2-(6'-carbometoxihexil)-4(R)-hidroxi-ciclopentano-1,3-diona por la acción fermentativa del microorganismo Dipodascus uninucleatus ó Schizosaccharomyces pombe, e  
incluye las mejoras siguientes:

1. Incubar el microorganismo en un medio que comprende 3 g de citrato de sodio, 5 g de dihidrogeno-ortofosfato de potasio anhidro, 3 g de nitrato de amonio anhidro, 0,2 g. de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,1 g de cloruro de calcio dihidratado, 5 g de extracto de levadura, 5 g de casamino-ácidos, 40 g de glucosa y 1 litro de agua, y que tiene un pH comprendido entre 5 y 6, y mantener una concentración de glucosa subsiguiente de 0,1% y un pH subsiguiente comprendido entre 4,2 y 4,7 hasta que se alcanza una concentración del microorganismo del 25% en el me-

dio;

2. añadir subsiguientemente el substrato al medio a un ritmo de 0,5 g por hora y por cada 10 litros de medio;

3. mantener la concentración de glucosa subsiguiente en 0,1% durante las etapas arriba indicadas por medio de alimentación por cargas o continua; y,

4. mantener el pH subsiguiente del medio entre 4,2 y 4,7 durante las etapas 1 y 2 del procedimiento por adición de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M.

10 En una operación típica de 72 horas de este procedimiento mejorado, es posible una conversión comprendida entre 35 y 75 gramos de substrato en producto, por cada 10 litros.

15 En este procedimiento mejorado se pueden utilizar los microorganismos siguientes de la clase Ascomicetos para la conversión de una ciclopentano-1,3,4-triona sustituida en la posición 2 ó una 3-alcoxi-ciclopent-2-eno-1, 4-diona sustituida en la posición 2 en una 4(R)-hidroxi-ciclopentano-1,3-diona sustituida en la posición 2:

20 Orden - Endomicetales

Byssoclamys fulva

Dipodascus uninucleatus

Dipodascus aggregatus

Dipodascus albidus

25 Zygosaccharomyces priorianus

Orden - Endomicetales (continuación)

- Zygosaccharomyces ashbya  
Saccharomyces cerevisiae  
Saccharomyces cerevisiae var. odessa  
Saccharomyces cerevisiae fragilis  
5 Saccharomyces cerevisiae acidifaciens  
Saccharomyces cerevisiae lactis  
Saccharomyces cerevisiae dobzanskii  
Endomycopsis fibuliger  
Endomycopsis javaanesis  
10 Hansenula anomala  
Schizosaccharomyces pombe  
Schizosaccharomyces octosporum

Orden - Moniliales

- Rhodotorula aurantiaca  
15 Rhodotorula pallida  
Geotrichum candidum  
Torulopsis pulcherrima  
Candida krusei  
Gliocladium fimbriatum  
20 Gliocladium vermoeseni  
Paecilomyces varioti  
Stachybotrys lobulata  
Trichoderma viride  
Memmoniella echinata  
25 Gliocladium roseum

Orden - Moniliales (continuación)

Fusarium decemcellulare

Alternaria tenuis

Gliocladium catenulatum

5

Orden - Eurotiales

Penicillium striatum

P. claviforme

P. pseudostromaticum

P. roqueforti

10

P. caseicolum

P. expansum

P. purpurogenum

P. varioti

P. frequentans

15

P. duclauxi

P. multicolor

P. sclerotiorum

P. granulatum

P. vermiculatum

20

P. terlikowskii

P. italicum

Aspergillus ustus

A. restrictus

A. unguis

25

A. terreus

Orden - Eurotiales (continuación)

A. luchensis

A. ornatus

Orden - Nucorales

5 Absidia blakesleeana

Absidia regnieri

Mucor Rammannianus

Zygorhynchus heterogamus (+)

Pharmolomyces articulatus

10 Phycomyces blakesleeanus

Este procedimiento mejorado ofrece varias ventajas inesperadas sobre el procedimiento de la técnica anterior de Sih y otros. El mantenimiento de la concentración de hidratos de carbono subsiguiente y el pH subsiguiente del medio entre 0,1% y 1,0% y entre 4 y 5 respectivamente, durante las etapas de incubación del microorganismo y adición de substrato da como resultado una proliferación muy rápida del microorganismo hasta alcanzar una concentración comprendida entre 20% y 35% en el medio y una velocidad de conversión aumentada de substrato en producto comprendida entre 0,4 y 1,0 gramos por hora y por cada 10 litros de medio. En el procedimiento de Sih y otros, una concentración de microorganismo del 10% y una velocidad de conversión de aproximadamente 0,2 gramos de substrato por hora y por cada 10 litros de medio repre

senta los parámetros máximos del procedimiento. Por esta razón, este procedimiento mejorado permite un aumento de 2 a 3 veces en la concentración de microorganismo en la etapa de incubación y un aumento de 2 a 5 veces en la velocidad de conversión del sustrato. Además, la cantidad total de sustrato que se puede convertir en un período de 72 horas es de 35 a 80 gramos por cada 10 litros de medio, o un aumento de 7 a 15 veces sobre la cantidad convertida por el procedimiento de la técnica anterior.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Ejemplo 1

Se utilizó un medio nutriente con la composición siguiente para la incubación del microorganismo y la conversión del sustrato:

	<u>g/litro de agua</u>
15 Citrato trisódico	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhidro)	5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (anhidro)	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
20 CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1
Extracto de levadura	5
Casamino-ácidos	5
Glucosa	40

Se utilizó la cantidad que cabía en una anilla normalizada del desarrollo en la superficie de un cultivo

en pico de flauta en agar de extracto de malta que se ha  
bía preparado una semana antes de Dipodascus uninucleatus  
para inocular 50 ml del medio arriba indicado en un matraz  
Erlenmeyer de 250 ml. El matraz se incubó a una temperatu  
5 ra comprendida entre 26° y 32°C y se agitó a 300 r.p.m.  
en una máquina rotativa de sacudidas durante 36 horas. Des  
pués de ello, se efectuó una transferencia de 5% en volu  
men a un matraz Fernbach de 2,8 litros que contenía 1 li  
tro del mismo medio nutriente. Al cabo de 24 horas de incu  
10 bación, cuando el desarrollo del cultivo alcanzaba al menos  
25% de sólidos, se añadieron en forma de polvo 400 mg del  
compuesto 2-(6'-carbometoxihexil)-ciclopentano-1,3,4-trio  
na a cada matraz Fernbach cada 8 horas durante los 3 días  
inmediatamente siguientes. Durante el curso de la conver  
15 sión, el pH del medio se mantuvo entre 4,2 y 4,5 mediante  
el empleo de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M, y la concentración de glucosa se  
mantuvo entre 0,1 y 0,4% mediante alimentación de glucosa  
por cargas. La conversión de 2-(6'-carbometoxihexil)-ciclo  
20 pentano-1,3,4-triona en 2-(6'-carbometoxi)-4(R)-hidroxi  
ciclopentano-1,3-diona se comprobó periódicamente por ex  
tracción de la malta muestreada con 0,5 volúmenes de ace  
tato de etilo y manchas del residuo (suspendido en aceto  
na) sobre una placa de cromatografía en capa delgada uti  
lizando un sistema de disolvente que comprendía: 110 ml  
25 de acetato de etilo, 50 ml de isooctano, y 20 ml de ácido

acético. Las manchas de sustrato y producto se detectaron con radiación ultravioleta de onda corta. Transcurridas 72 horas desde el momento de la primera adición de sustrato, se separaron las células por filtración. El líquido sobrenadante se saturó con NaCl, se acidificó con HCl hasta pH 2,0, y se extrajo con un volumen de acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se separó y se evaporó a sequedad. La recristalización en acetato de etilo-éter de petróleo permitió obtener 2,8 g de producto; p.f. 80-86°C;  $[\alpha]_D^{25} +20,3$  (CHCl<sub>3</sub>)

El empleo de 2-(6'-carbometoxihexil)-3-metoxiciclopent-2-eno-1,4-diona en lugar de 2-(6'-carbometoxihexil)-ciclopentano-1,3,4-triona como sustrato produce 2'-(6'-carbometoxihexil)-4(R)-hidroxi-ciclopenteno-1,3-diona con un rendimiento sustancialmente igual al anterior.

#### Ejemplo 2

Se llevó a una escala mayor el procedimiento del Ejemplo 1 en un fermentador de 14 litros utilizando el mismo medio. Se utilizó 1 litro de un cultivo obtenido durante 24 horas, de Dipodascus uninucleatus en un matraz Fernbach de 2,8 litros, para inocular 9 litros de medio dispuestos en un fermentador de 14 litros. Las condiciones para la fermentación fueron: temperatura, 30°C; aireación, 5 litros de aire/minuto; agitación, 300 r.p.m.

Se utilizó el antiespumante "Antifoam-130S" pa

ra reprimir la formación de espuma en caso necesario. Al  
cabo de 24 horas de incubación, se añadieron 4 g de 2-(6'-  
carbomotoxihexil)-ciclopentano-1,3,4-triona en polvo cada  
8 horas durante las 72 horas siguientes. Durante el curso  
5 de la conversión, se mantuvo el pH del medio entre 4,2 y  
4,5 mediante el empleo de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M, y la concentración  
de glucosa se mantuvo entre 0,1 y 0,4% mediante alimenta-  
ción de glucosa por cargas. Transcurridas 72 horas desde  
el momento de la primera adición de 2-(6'-carbomotoxihexil)-  
10 ciclopentano-1,3,4-triona, se separaron las células y se  
aisló el producto, 2-(6'-carbomotoxihexil)-4(R)-hidroxi-  
ciclopentano-1,3-diona, como se ha descrito en el Ejemplo  
1. El rendimiento del producto recristalizado fue de 25,0  
g; p.f. 89,5-91°C;  $[\alpha]_D^{25} +19,1$  ( $\text{CHCl}_3$ ).

15 En este ejemplo, se puede utilizar como substrato  
2-(6'-carbomotoxihexil)-3-metoxi-ciclopent-2-eno-1,4-  
diona, sin merma del rendimiento en producto.

### Ejemplo 3

20 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 2, ex-  
cepto que el substrato se disolvió en dimetilformamida  
(10 g en 20 ml de DMF) y se alimentó continuamente al fer-  
mentador a una velocidad de 0,5 g/hora. La alimentación  
del substrato se llevó a cabo mediante el uso de un tubo  
de teflón unido a una bomba de jeringuilla para evitar  
el efecto corrosivo de la DMF sobre los tubos de tygon o  
25 de caucho. La velocidad de conversión mediante el empleo

de un aporte continuo de alimentación de sustrato fue apreciablemente mayor que la correspondiente al caso de la alimentación por cargas: 36 gramos en 60 horas, frente a 36 gramos en 70 horas.

5

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 10 de Diciembre de 1973, bajo el número 423.257, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

- REIVINDICACIONES -

15

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

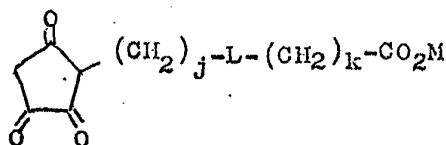
20

1ª.- Un procedimiento mejorado para preparar una 4(R)-hidroxi-ciclopentano-1,3-diona ópticamente activa sustituida en la posición 2 por conversión de un sustrato de una ciclopentano-1,3,4-triona sustituida en la posición 2 ó un sustrato de una 3-alcóxi-ciclopent-2-eno-1,4-diona sustituida en la posición 2 mediante la utilización de un microorganismo de la clase Ascomicetos, en el que la mejora se caracteriza -

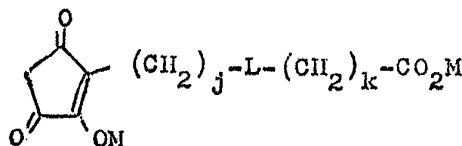
25

por incubar el microorganismo en un medio que tiene una  
 concentración inicial de hidratos de carbono comprendida  
 entre 2% y 6% y un pH inicial comprendido entre 5 y 6, y  
 mantener una concentración subsiguiente de hidratos de  
 5 carbono comprendida entre 0,1% y 1% y un pH subsiguiente  
 comprendido entre 4 y 5 hasta que se alcanza en el medio  
 una concentración de células del microorganismo compren-  
 dida entre 20% y 35%; añadir el substrato al medio a una  
 velocidad comprendida entre 0,4 gramos y 1,0 gramos por  
 10 hora y por cada 10 litros de medio; y mantener la concen-  
 tración subsiguiente de hidratos de carbono del medio en-  
 tre 0,1% y 1,0% y el pH subsiguiente del medio entre 4 y  
 5 durante la adición del substrato.

2º.- Un procedimiento mejorado de acuerdo con  
 15 la reivindicación 1ª, en el que el substrato se seleccio-  
 na de entre el grupo de compuestos que tienen la fórmula



20 6



25

en las que L es etileno o vinileno, M es alcohol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y j y k son números enteros que tienen un valor comprendido entre 0 y 4.

3<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que dicho substrato es 2-(6'-carbomexihexil)-ciclopentano-1,3,4-triona.

4<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que dicho substrato es 2-(6'-carbomexihexil)-3-metoxi-ciclopent-2-eno-1,4-diona.

5<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que la velocidad de adición de substrato es de 0,5 gramos por hora por cada 10 litros.

6<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que la concentración de hidratos de carbono es 0,1% y el hidrato de carbono es glucosa.

7<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que la concentración de hidratos de carbono se mantiene mediante alimentación por cargas.

8<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que la concentración de hidratos de carbono se mantiene por medio de alimentación continua.

9<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que dicho medio comprende: 3 g de citrato de sodio, 5 g de dihidrogeno-ortofosfato de potasio anhidro, 2 g de sulfato de amonio, 0,2 g de cloruro de mag

nesio heptahidratado, 0,1 g de cloruro de calcio dihidrato, 5 g de extracto de levadura, 5 g de casamino-ácidos, 40 g de glucosa, y 1 litro de agua.

5 10ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el pH se mantiene entre 4,2 y 4,7.

11ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el pH se mantiene mediante el empleo de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M.

10 12ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho microorganismo es Dipodascus uninucleatus.

13ª.- Un procedimiento mejorado para preparar una 4(R)-hidroxi-ciclopentano-1,3-diona ópticamente activa sustituida en la posición 2.

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintiuna hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 16. SET. 1976

P.A.

Alberto de Elzaburu  
Por Poder

