



PATENTE DE INVENCION

270607

MEMORIA DESCRIPTIVA

Sobre:

"METODO PARA PRODUCIR UN NUEVO ANTIBIOTICO"

-----

Solicitante: LØVENS KEMISKE FABRIK VED A.KONGSTED, de  
nacionalidad danesa, domiciliada en 11  
Ballerup Byvej - BALLERUP (Dinamarca)

Inventores: D. Wagn Ole Godtfredsen, D. Henning Otto  
Bojsen Lorck y D. Sverre Jahnsen, todos  
residentes en Dinamarca.-

-----



2700-37

La presente invención tiene por finalidad proveer un método para producir un antibiótico que hasta ahora era desconocido que, en lo que sigue se denominará Antibiótico ZN-6, o sus sales.

5. El antibiótico ZN-6 es una substancia débilmente ácida capaz de formar sales con una variedad de bases inorgánicas y orgánicas, y además de mostró formar solvatos con ciertos solventes.

10. En el método de la presente invención, el nuevo compuesto antibióticamente activo, o sus sales, puede obtenerse bajo la forma de soluciones divididas o como concentrados crudos, como así también en forma cristalina pura y, en lo que se refiere al Antibiótico ZN-6 mismo, se la puede obtener bajo la forma de uno de sus solvatos cristalinos.

FD/EM

Más específicamente, la presente invención se relaciona con un mé



15. todo que comprende la fermentación, bajo condiciones controladas, del hongo *Fusidium coccineum* Fuck K. Tubaki hasta que se produjo una cantidad substancial de Antibiótico ZN-6 por dicho hongo, y la recuperación de la substancia así obtenida, incluyendo su conversión a una de sus sales o solvatos, y los pasos de concentración, aislación, cristalización o purificación del Antibiótico ZN-6 o sus sales y solvatos para obtener una de las formas deseadas de presentación mencionadas más arriba.
20. El organismo productor del antibiótico de la presente invención puede obtenerse del Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland. La cepa está clasificada con la especie *Fusidium coccineum*, y un sinónimo de dicha especie es *Ramularia coccinea*. El género *Fusidium* pertenece a la tribu Oosporae, la familia *Mucedinaceae*, y el orden *Hyphomycetales*.
25. El Antibiótico ZN-6 es un ácido carboxílico debil. Una titulación electrométrica, llevada a cabo en etanol acuoso al 80 %, proporciona un valor  $pK_a$  de 7,25 que corresponde a un valor  $pK_a$  de aproximadamente 5,3 en agua. Además, los estudios de titulación indican un peso equivalente de la substancia que alcanza a 516.
30. Las investigaciones relacionadas con su estructura química, y sus datos analíticos, indican que la substancia tiene la fórmula elemental  $C_{31}H_{48}O_6$  y contiene en la molécula un sistema de anillo ciclopentenopolihidrofenantreno que está substituido con dos grupos hidroxilo, un grupo acetoxilo y cuatro grupos metilo, y que en la posición 17 está conectado, mediante
35. una doble unión, con el átomo de carbono  $\alpha$  del ácido 5-metil-4,5-heptenóico.
- No se estableció aún con exactitud la fórmula estructural del Antibiótico ZN-6; sin embargo, se cree que la substancia tiene la siguiente

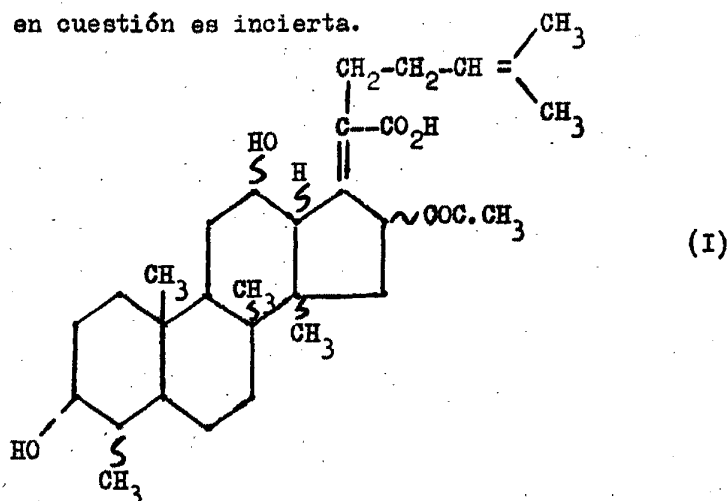
270607



- 3 -

270607

40. fórmula (I), en la cual las líneas de conexión onduladas indican que la configuración en cuestión es incierta.



45.

El Antibiótico ZN-6 es escasamente soluble en agua y hexano, mientras que es soluble en etanol, acetona, metil butil cetona, amil acetato, cloroformo y solventes similares.

50.

De acuerdo con cromatografía sobre papel, usando los sistemas descritos por Bush (Biochemical Journal, vol. 50, (1952), pág. 370), el Antibiótico ZN-6 tiene los valores  $R_f$  0,38 y 0,73 en el sistema B(1) y B(5) respectivamente.

55.

Con benceno forma un solvato cristalino en benceno, que es soluble en benceno caliente pero escasamente soluble en benceno frío. Dicho solvato tiene p.f. = 189-189,5 °C.

60.

Después de secar dicho solvato a 50 °C y a una presión absoluta de 0,01 mm de Hg hasta peso constante, se obtiene un producto puro que está libre de benceno y que tiene un punto de fusión de 191-192 °C, una rotación específica  $[\alpha]_D^{22} = -9^\circ$  en una solución al 1 %



270607

en clorofomo, mientras que a 220 mμ tiene un coeficiente de extinción molar de 3.000 en etanol y carece de bandas características de absorción por encima de esta longitud de onda.

65. El Antibiótico ZN-6 puro se caracteriza además por su espectro en la región del infrarrojo según se muestra en la fig. 1, de donde se deduce que manifiesta bandas características de absorción a las siguientes frecuencias expresadas en centímetros recíprocos: 1265, 1385, 1695, 1730 y 3450, usando para esta finalidad la técnica del bromuro de potasio.

70. De acuerdo con experimentos bacteriológicos, el Antibiótico ZN-6 ha demostrado ser eficaz contra una cantidad de micro-organismos patógenos, especialmente Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae incluyendo las cepas resistentes a la penicilina, Neisseria meningitidis, Mycobacterium tuberculosis y las cepas resistentes a la estreptomomicina, hidrazida de ácido isonicotínico o ácido p-aminosalicílico, del mismo organismo, y Corynebacterium diphtheriae.

80. La actividad antifúngica y antibacteriana más específica del antibiótico de la presente invención, puede observarse en la siguiente tabla, en la cual se expresa la actividad como cantidad de la sal de sodio del Antibiótico ZN-6 en miligramos por litro que produce una inhibición del 50 % del organismo en cuestión después del período de tiempo (en horas) que se indica.

<u>Organismo</u>	<u>Substrato</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Actividad</u>
Staphylococcus aureus	Caldo	24	0,063
85. Staphylococcus aureus, cepa productora de penicilinasa	"	"	0,050



270607

90.	Staphylococcus aureus, cepa de laboratorio resistente a la penicilina, que no produce penicilinasas	Caldo	48	0,16
	Neisseria gonorrhoeae	Ascitis sangre agar	24	0,32
95.	Neisseria gonorrhoeae, cepa resistente a la penicilina	"	24	0,63
	Neisseria meningitides	"	"	0,32
	Haemophilus influenzae	"	"	10,0
	Diplococcus pneumoniae	Caldo con 5 % de suero	"	16,0
100.	Streptococcus pyogenes	"	"	3,2
	" zoepidemicus	"	"	2,5
	" agalactiae	"	"	16,0
	" lactis	"	"	13,0
	" faecalis	"	"	5,0
105.	Pseudomonas aeruginosa	Caldo	"	> 30,0
	Vibrio comma	"	"	> 30,0
	Alcaligenes faecalis	"	"	13,0
	Escherichia coli	"	"	> 30,0
	Klebsiella pneumoniae	"	"	> 30,0
110.	Serratia marcescens	"	"	> 30,0
	Proteus vulgaris	"	"	> 30,0
	Salmonella typhimurium	"	"	> 100,0
	Bacillus subtilis	"	"	1,6
115.	Mycobacterium tuberculosis, var. hum.	Dubos'	144	0,79



270007

	Mycobacterium tuberculosis, var. hum. cepa resistente a la estreptomycinina	" "	1,6
120.	Mycobacterium tuberculosis, var. hum., cepa resistente al ácido p-amino-salicílico	" "	1,6
125.	Mycobacterium tuberculosis, var. hum., cepa resistente a la hidrazida del ácido isonicotínico	" 240	0,50
	Candida albicans	Sabourauds <sup>1</sup> 24	100,0
	Tricophyton mentagrophytes	" 72	100,0
	Aspergillus niger	" "	100,0
	Clostridium perfringens	Medio de tioglicolato 48	0,25
130.	Clostridium tetani	Medio de tioglicolato 48	0,02
	Actinomyces bovis	" 48	0,05
	Corynebacterium pyogenes	Caldo de infusión de carne con 10 % de suero 24	0,05

- Los ensayos clínicos llevados a cabo con respecto a la presente invención demostraron que el Antibiótico ZN-6 y ciertas de sus sales satisfacen los requisitos para los antibióticos farmacéuticamente aceptables, puesto que son utilizables en el tratamiento de enfermedades infecciosas, y es particularmente valioso en el tratamiento de aquellas que son producidas por diversas cepas de Staphylococci,
140. incluyendo las cepas resistentes a la penicilina.

Para fines farmacéuticos, se puede usar el Antibiótico ZN-6



270607

ya sea como tal o bajo la forma de sus sales más o menos solubles en agua, con bases inorgánicas u orgánicas atóxicas.

Aunque se puede administrar parenteralmente soluciones acu-

145. sas de las sales de Antibiótico ZN-5, se administra preferentemente las sales por boca, puesto que pasan facilmente del tracto gastrointestinal a los flúidos del cuerpo, en los cuales es demostrable una concentración apropiada del antibiótico durante un período satisfactorio de tiempo.

150. Esto fué establecido en un ensayo de reabsorción, en el cual se administró individualmente a 8 personas por boca un solo tratamiento consistente en dos cápsulas cada una de las cuales contenían 0,250 g de la sal de sodio del Antibiótico ZN-6, después de lo cual se determinó las concentraciones en el plasma a intervalos fijos después

155. de la ingestión. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla II, en la cual los valores indican dicha concentración en el plasma expresada en microgramos por mililitro de plasma, una o más horas después de la ingestión.

TABLA II

160.	<u>Personas/horas</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>7</u>	<u>9</u>	<u>12</u>
	A	1,6	9,5	7,2	5,5	2,9	2,1	1,5
	B grupo I	0,9	1,2	3,0	2,7	3,6	3,1	2,2
	C	0,6	10,0	6,1	6,1	5,2	4,0	2,2
	D	0,8	11,0	8,5	9,3	5,2	4,7	1,7
165.	E	1,6	6,6	8,1	6,6	4,0	3,2	2,4
	F grupo II	0,6	1,7	7,5	6,1	3,4	3,0	2,4



270607

G 2.5 12,3 8,6 6,7 3,5 3,1 1,8

170. En el grupo I, se administró a las personas la droga con el estómago vacío, mientras que a las personas del grupo II se les administró la droga después de una comida.

175. En un ensayo similar, la concentración término medio en el plasma, hallada 24 hr después de la ingestión de la misma cantidad de la droga, alcanzó a 0,75 µg/ml, indicando la eliminación extremadamente lenta de la substancia desde el cuerpo. Se observó una toxicidad suficientemente poco aguda del Antibiótico ZN-6, en experimentos sobre animales en los cuales los animales de ensayo eran ratones. Se encontró los siguientes valores de DL<sub>50</sub> expresados en miligramos por kilogramo de peso del cuerpo.

- a) La sal de sodio del Antibiótico ZN-6 administrada por vía endovenosa 200-250
- 180. b) La sal de sodio del Antibiótico ZN-6 administrada por vía subcutánea 400
- c) El solvato en benceno del Antibiótico ZN-6, administrado por vía oral 1500

185. Además, en experimentos toxicológicos prolongados, en los cuales se trató por vía oral los animales, es decir ratas macho y hembra, durante 6 días por semana con la sal de sodio del Antibiótico ZN-6 en dosis de 0,400 g/kg de peso del cuerpo, no se alcanzó a observar diferencias significativas de peso entre los animales de ensayo y los animales testigo, ni cambios patológicos algunos causados por la droga, lo que indica la ausencia de toxicidad crónica.

190. Las propiedades únicas del Antibiótico ZN-6 han sido demostradas en una manera más asombrosa, mediante el uso clínico controlado de la sal



27000

de sodio del Antibiótico ZN-6 bajo la forma de una composición apropiada  
195. encapsulada en cápsulas de gelatina con pacientes que adolecían de furun-  
culosis, osteomielitis y endocarditis.

Después del tratamiento oral de los pacientes a intervalos dia-  
rios o similares convenientes para el uso práctico durante un período sufi-  
ciente de tiempo, las curas fueron 100 % sin que se produjeran efectos se-  
200. cundarios o reacciones tóxicas, y no se observó recaídas aún después obser-  
vaciones prolongadas.

Para tratamientos clínicos, son aplicables las sales solubles en  
agua del Antibiótico ZN-6, y particularmente la sal de sodio.

Por otra parte, se puede usar también para administración oral  
205. las sales levemente solubles en agua del Antibiótico ZN-6 o aún el ácido  
libre, con lo cual el régimen de absorción de la droga disminuye de tal ma-  
nera que ejerce de preferencia su actividad en el mismo tracto gastro in-  
testinal, lo cual puede resultar deseable en el tratamiento de ciertas en-  
fermedades.

210. Además, las sales levemente solubles en agua del Antibiótico  
ZN-6 pueden inyectarse bajo la forma de una suspensión de la sal en un me-  
dio apropiado, para producir niveles aún más prolongados en sangre del an-  
tibiótico que lo descripto más arriba.

En el método de la presente invención, se hace crecer el hongo  
215. Fusidium coccineum Fuck K. Tubaki bajo condiciones aeróbicas en un medio  
de fermentación que contiene carbohidratos, fuentes de nitrógeno, per e-  
jemplo proteínas, y cantidades apropiadas de las sales inorgánicas y otras  
substancias que son necesarias para la nutrición del hongo, y se continúa



270907

220. la fermentación hasta que se comunicó una substancial actividad antibiótica a dicha solución, después de lo cual se recupera el Antibiótico ZN-6, así producido, se le concentra y se le aísla en forma pura o se le convierte a una de sus sales con bases farmacéuticamente aceptables mediante reacciones conocidas.

225. Al poner en práctica el método de la presente invención, se determina el régimen de producción del Antibiótico ZN-6 a través de toda la fermentación mediante la evaluación de rutina de la actividad del cultivo filtrado, finalidad para la cual se puede emplear el ensayo sobre placa de agar, usando por ejemplo Staphylococcus aureus como organismo de ensayo.

230. De acuerdo con los resultados obtenidos de la producción del Antibiótico ZN-6 en escala técnica, el rendimiento óptimo de la substancia se obtiene en el curso de 80 a 100 hr, al llevar a cabo el procedimiento de fermentación entre 20 y 30 °C, y de preferencia entre 24 y 28 °C.

235. Sin embargo, dichas gamas no son de carácter limitativo, puesto que el período de tiempo necesario para obtener dichos rendimientos depende en cierta medida del diseño mecánico del recipiente de fermentación y del tipo de agitador que se usa.

240. A este respecto, corresponde mencionar que los recipientes utilizados son unidades de dimensiones comerciales que contienen 10 a 30 m<sup>3</sup> del medio de cultivo y no específicamente diseñados para la producción del Antibiótico ZN-6.

Una variedad de los medios de cultivo ya conocidos han demostrado ser utilizables como medios de cultivo para poner en práctica el método de la presente invención, aunque se prefiere los que contienen, como fuen-



270607

te de proteína, licor de maceración de maíz o harina de soya, y glucosa o  
245. sacarosa como fuente de carbohidratos.

Entre los otros constituyentes de un medio de cultivo apropiado se puede mencionar, por ejemplo, el extracto de levadura, glicerina, maltosa, fructosa, ácidos grasos, hidrolizado de caseína, ciertos aminoácidos y vitaminas solubles en agua.

250. Cuando cesa la producción del Antibiótico ZN-6 en el procedimiento de fermentación, o cuando se obtuvo un rendimiento satisfactorio, se podrá recuperar la sustancia antibiótica mediante una variedad de procedimientos.

El primer paso consiste ventajosamente en separar el micelio con  
255. respecto al líquido de cultivo, por ejemplo por filtración. Se puede concentrar el Antibiótico ZN-6 poniendo en contacto el caldo con un agente adsorbente sólido y eluyendo la sustancia con respecto a dicho agente, para lo cual se puede usar, como agente adsorbente, por ejemplo carbón activo o resinas intercambiadoras de iones o, de preferencia, se extrae el caldo  
260. con un solvente apropiado o mezcla de solventes, si fuera necesario después de haber ajustado el medio acuoso que contiene el Antibiótico ZN-6 a un valor apropiado de pH.

Como solventes apropiados se puede mencionar los ésteres, cetonas o hidrocarburos halogenados. Sin embargo, en la producción a escala comercial, han demostrado ser especialmente apropiados para la extracción del  
265. caldo de fermentación la metil isobutil cetona, amil acetato y butil acetato.

Una vez que se extrajo la sustancia activa del caldo, se la pu



2 080

270. de recuperar por evaporación de la fase orgánica hasta pequeño volumen, a partir del cual se puede precipitar el Antibiótico ZN-6 por enfriamiento o se le puede precipitar agregando al concentrado un componente que reduce la solubilidad del Antibiótico ZN-6, y de preferencia por evaporación de la fase orgánica hasta sequedad y agregado del benceno a fin de obtener el solvato en benceno fácilmente cristizable que se mencionó más arriba.
275. Las propiedades ácidas del Antibiótico ZN-6 permiten también llevar a cabo una extracción subsiguiente de la fase orgánica mediante una solución alcalina acuosa o mediante una suspensión acuosa de un compuesto alcalino, con lo cual se obtiene soluciones acuosas más o menos concentradas de las sales del Antibiótico ZN-6.
280. Por acidificación de estas soluciones, se puede precipitar el Antibiótico ZN-6 o, si así fuera conveniente, se podrá aislar como tal la sal del Antibiótico ZN-6 contenida en las mismas.
- En una forma apropiada de poner en práctica la presente invención, se produce directamente el solvato en benceno fácilmente cristizable a
285. partir de dicha solución acuosa de una sal de Antibiótico ZN-6, si fuera necesario después de haber eliminado una parte del agua por evaporación, por ejemplo en un evaporador de presión reducida, agregando a la solución acuosa concentrada una cantidad suficiente de benceno para formar el solvato y acidificar para precipitar el Antibiótico ZN-6 bajo la forma de dicho
290. solvato, que después de aislación y secado suministra ya sea el solvato puro en benceno o Antibiótico ZN-6 mismo, según las condiciones de secado y la temperatura utilizada, desprendiéndose el benceno con respecto al solvato a las temperaturas elevadas.



270307

- Con respecto a la purificación del Antibiótico ZN-6, su capacidad
295. para formar solvatos con ciertos solventes constituye una particularidad importante. Por ejemplo, en otra forma apropiada de poner en práctica la presente invención, se disuelve el Antibiótico ZN-6 crudo en un pequeño volumen de metanol caliente a partir del cual se cristaliza el solvato en metanol por enfriamiento en una forma sorprendentemente pura, razón por la
300. cual este método resulta particularmente apropiado para obtener una calidad farmacéuticamente aceptable de la substancia. Dicho solvato en metanol tiene un punto de fusión de 179-179,5 °C.
- Si se desea obtener sales del Antibiótico ZN-6, se las puede producir mediante simple neutralización del Antibiótico ZN-6 o uno de sus solvatos con la base en cuestión en presencia de un medio apropiado de reacción que facilita la reacción, y a partir del cual se puede precipitar la sal o, si fuera necesario, se puede precipitar agregando un componente apropiado para disminuir la solubilidad de la sal deseada, o se puede aislar la sal por evaporación de la mezcla de reacción.
305. Se puede también hacer reaccionar una sal de Antibiótico ZN-6, preparada previamente, con la base en cuestión o se puede preparar la sal deseada del Antibiótico ZN-6 mediante una doble descomposición de una sal del antibiótico ZN-6 previamente preparada y otra sal que contiene el ión de metal o base deseados.
310. Entre las sales de interés que se han preparado se encuentran las sales solubles en agua de sodio, potasio, amonio, trietilamina, piperidina, morfolina, ciclohexilamina, y monoctanolamina, y las sales levemente solubles en agua de calcio, magnesio, dibencil-etilen-diamina, bencil-β-fenil-



270607

etilamina y procaína.

315. Entre otras sales que se pueden producir de acuerdo con el método de la presente invención se puede mencionar, por ejemplo, las que contienen como componente de base la pirrolidina, piperazina, guanidina, metilamina, etilamina, bencilamina o aminas substituidas o no substituidas similares, además de aminas cuaternarias tales como colina y sus derivados u otros anti-
320. bióticos que tengan propiedades básicas, por ejemplo la estreptomycinina.

Se ilustra la presente invención mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLO I

El solvente en benceno del Antibiótico ZM-6

- En un tanque de fermentación de 1,5 m<sup>3</sup>, de acero inoxidable, equipado con agitador, se forma 1,00 m<sup>3</sup> de un medio de cultivo que tiene la siguiente composición.
- 325.

	Glucosa	20,0 kg
	Harina de carne y de huesos	20,0 kg
330.	Licor de maceración de maíz, 50 % de substancia seca	2,5 kg
	Glicerol	7,5 kg
	NaCl	4,0 kg
	MgSO <sub>4</sub>	0,05 g
	Agua corriente, hasta	1000 lt

335. El medio de cultivo tiene un valor de pH = 6,1, ajustándose este valor a 6,5 mediante el agregado de una solución diluida de NaOH, después de lo cual se esteriliza el medio por calentamiento. Después de enfriar, se le inocular con 3 lt de un cultivo de Fusidium coccineum Fuck K. Tubaki que se hizo crecer durante 48 hr en un frasco sacudidor a 28 °C. Se agita



2700

340. los contenidos del tanque y se los aerea a razón de  $0,6 \text{ m}^3$  de aire por hora a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 96 hr. Durante este período de tiempo es innecesario ajustar el pH para mantener el valor mencionado más arriba de 6,5. Después de dicho período de fermentación, se comprueba que la actividad antibiótica del medio de cultivo, determinada por el ensayo usual en taza de agar con *Staphylococcus aureus*, corresponde a un contenido de 70 mg del Antibiótico ZN-6 por litro comparándola con la actividad de dicha sustancia determinada por el mismo método.
- 345.

Se separa el micelio con respecto al medio de cultivo mediante filtración, y la cantidad de filtrado es 700 lt. El pH del filtrado se ajusta a 3,3 mediante el agregado de una solución al 25 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y se extrae el filtrado con 230 lt de butil acetato a contracorriente en un extractor Fodbielniak. Se extrae la fase butil acetato, así obtenida, mediante una porción de 77 lt de agua a la cual se agrega una solución al 10 % de NaOH hasta que el pH de la fase acuosa es 10,0, después de lo cual

350. se separa la fase acuosa con respecto a la fase butil acetato. Se ajusta a 3,2 el pH de la fase acuosa mediante el agregado de una solución al 25 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y se extrae la solución mediante 40 lt de metil isobutil cetona. Se separa la fase metil isobutil cetona con respecto a la fase acuosa, se trata con 40 g de carbón activo, y luego se evapora a sequedad bajo presión reducida a una temperatura de ebullición de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se disuelve el residuo en 500 ml de benceno y se deja reposar la solución durante la noche en un refrigerador. De esta manera, cristaliza el solvato en benceno del Antibiótico ZN-6. Se le filtra y se le recristaliza a partir de benceno, obteniéndose 12,0 g de la sustancia pura con p.f.  $-189-189,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- 355.
- 360.



270307

365.

EJEMPLO II

Sal de sodio del Antibiótico ZN-6

Se suspende 500 mg del solvato en benceno, producido de acuerdo con el Ejemplo I, en 20 ml de agua y a esta suspensión se agrega NaOH acuoso 1/2 N, hasta lograr pH = 9,0. Se filtra la solución y se agrega al filtrado 50 ml de n-butanol, después de lo cual se elimina los contenidos de agua de la solución mediante destilación azeotrópica bajo presión reducida. A partir del residuo se precipita la sal deseada de sodio mediante el agregado de éter. Se filtra, se lava con eter y se seca. Por recristalización a partir de etanol/acetona se obtiene 360 mg de la sal de sodio cristalina pura.

375.

EJEMPLO III

Producción del Antibiótico ZN-6

Se transfieren esporos de *Fusidium coccineum* Fuck K. Tubaki desde un plano inclinado de agar a 3 lt de un medio de calcio estéril que tiene la siguiente composición:

380.

Glicerina	7,5 g/lt
Licor de maceración de maíz	2,5 g/lt
Glucosa	10,0 g/lt
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,6 g/lt
Harina de soya	3,0 g/lt
NaCl	4,0 g/lt
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/lt
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g/lt
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,004 g/lt

385.



270607

390. y se incuba aeróbicamente el cultivo a 27 °C durante 40 a 60 hr en un sacudidor de vaivén. Se puede usar directamente el material de siembra, así obtenido, como inoculum para un fermentador a escala comercial; en este caso, sin embargo, se le transfiere a un recipiente de 700 lt que contiene un medio de cultivo de la misma composición que el del fermentador a escala co-
395. mercial, y se incuba a 26 °C durante 40 a 48 hr a fin de lograr el desarrollo del crecimiento vegetativo del hongo antes de inocular el fermentador principal.

Luego se esteriliza 16.000 lt de un medio de cultivo que tiene la siguiente composición:

400.	Glucosa	30 g/lt
	Glicerina	5 g/lt
	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 g/lt
	$\text{NaNO}_3$	6 g/lt
	KCl	0,05 g/lt
405.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05 g/lt
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mg/lt
	Extracto de levadura (Difco)	0,12 g/lt

- que, antes de la esterilización, fué ajustado a pH = 7,2, en el fermentador principal a una temperatura de 120 °C durante 1/2 hr y, después de enfriar,
410. se inocula con una de las dos formas de material de inoculación mencionado más arriba. Mientras se agita, y forzando aire a través de un rociador a razón de aproximadamente 0,5 lt de aire por litro de fluido de cultivo por minuto, se produce el micelio y se continúa la fermentación a 26 °C durante 4 días.



270607

415. Se determina la actividad de las muestras del cultivo filtrado, a través de la fermentación, midiendo la zona de inhibición producida en el método de taza de agar, en el cual el organismo de ensayo es *Staphylococcus aureus*. Una vez terminado el procedimiento, la actividad que se obtiene corresponde a una concentración de Antibiótico ZN-6 en el medio de cultivo que alcanza a 150 µg/ml.
- 420.

EJEMPLO IV

Producción del Antibiótico ZN-6

Se esteriliza 16.000 lt de un medio de cultivo que tiene la siguiente composición:

425.	Licor de maceración de maíz, 50 %	2,5 g/lt
	Harina de soya o harina de carne	10,0 g/lt
	Sacarosa	30,0 g/lt
	Glicerina	7,5 g/lt
	NaCl	4,0 g/lt
430.	$KH_2PO_4$	0,5 g/lt
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g/lt

que, antes de la esterilización, fué ajustado a pH = 6,80 en el fermentador a 120 °C durante 1/2 hr. Después de enfriarlo, se inocula el medio con el inoculum mencionado en el Ejemplo III, y se continúa la fermentación durante 100 hr, obteniéndose así una concentración del Antibiótico ZN-6, en el medio de cultivo, que alcanza a 260 µg de acuerdo con el ensayo en taza de agar.

EJEMPLO V

Producción del Antibiótico ZN-6



440. Se esteriliza 16.000 lt de un medio de cultivo que tiene la siguiente composición:

Sacarosa	60,0 g/lt
Licor de maceración de maíz, 50 %	20,0 g/lt
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10,0 g/lt
445. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/lt

que, antes de esterilizar, fué ajustado a pH = 6,8 en el fermentador a 120 °C durante 1/2 hr y, después de enfriar, es inoculado con el inoculum mencionado en el Ejemplo III. Después de fermentar durante 100 hr bajo condiciones similares a las del Ejemplo III, el rendimiento del Antibiótico ZN-6 alcanza a 250 ug/ml de medio de cultivo.

#### EJEMPLO VI

##### Aislación y purificación del Antibiótico ZN-6

Se ajusta el caldo de fermentación clarificado (15.000 lt) del Ejemplo V (que contiene 3,75 kg del Antibiótico ZN-6, según se determina por el método en taza de agar) a pH = 6,0 y se extrae en un extractor Podbielniak con 3.000 lt de metil isobutil cetona. Se extrae luego este extracto, que contiene 3,4 kg del Antibiótico ZN-6, con 600 lt de hidróxido de sodio acuoso de pH = 11,5. De inmediato, después de la extracción, se ajusta la fase acuosa a pH = 9,3 y se evapora en un evaporador bajo presión reducida hasta un volumen de 150 lt que contiene 3,25 kg del Antibiótico ZN-6.

Se agrega 40 lt de benceno y, bajo agitación, se ajusta el pH de la fase acuosa a 5,0 mediante el agregado de ácido clorhídrico. Se continúa la agitación durante 4 hr, después de lo cual se filtra el precipitado,



270607

465. que consiste en el solvato en benceno del Antibiótico ZN-6, se lava con agua y benceno, y se seca. Se disuelve el producto crudo (2,8 kg) en 12 lt de cloruro de metileno, se filtra y se evapora a sequedad bajo presión reducida. Se disuelve el residuo en 3,2 lt de metanol caliente y, por enfriamiento a 0 °C, se cristaliza un solvato en metanol al cual se separa por filtración, se lava con 3 X 300 ml de metanol enfriado con hielo y se seca, obteniéndose 2,48 kg de solvato en metanol incoloro.

- Se suspende este producto en una mezcla de 750 ml de metanol y 1750 ml de acetona y, luego de agregar unas pocas gotas de indicador fenoftaleína, se agrega hidróxido de sodio acuoso al 33 % bajo agitación hasta que se desarrolla un color bastante rojo. Se filtra la solución resultante a través de dicálita, se mezcla con 5 lt de metil isobutil cetona y se concentra bajo presión reducida aproximadamente hasta 3 lt. Durante la concentración cristaliza la sal de sodio. Se la separa por filtración, se lava con acetona seguido por éter y se seca para obtener 2,35 kg de la sal de sodio pura.
- 475.
- 480.

EJEMPLO VII

Salas del Antibiótico ZN-6 con bases orgánicas

- Procedimiento general: A una solución de 517 mg del Antibiótico ZN-6 en 5 ml de acetona, se agrega 1 milimol de la base orgánica seguido por 2,5 ml de hexano, después de lo cual se hace cristalizar las sales por raspado. Se las recoge y se las purifica por recristalización a partir de un solvente apropiado.
- 485.

<u>Base</u>	<u>Recristalizado a partir de</u>	<u>p.f. = °C</u>
490. Trietilamina	Acetona	143 - 144



	Piperidina	Acetona	155 - 156
	Morfolina	"	112 - 114
	Ciclohexilamina	"	180 - 182
	Dibencil-etilen diamina +)	Etil acetato	112 - 113
495.	Bencil- $\beta$ -feniletilamina +)	Acetona-hexano	103 - 105
	Moncetanolamina	Acetona-hexano	130 - 132
	Procaína +)		

+ ) Escasamente soluble en agua.

#### EJEMPLO VIII

#### 500. Recuperación del Antibiótico ZN-6 a partir del caldo de fermentación

Se agita 200 ml de la resina intercambiadora de aniones Amberlite IRA 401 S (OH) durante 2 hr con tres porciones de 2 lt de un caldo clarificado que contiene 110  $\gamma$  del Antibiótico ZN-6 por mililitro. Durante la agitación se mantiene el pH a 9,5 mediante el agregado de hidróxido de sodio acuoso 2 N.

505.

El análisis de los filtrados muestra que se absorbió sobre la resina 85 % del antibiótico ZN-6. Después de filtración, se lava la resina con tres porciones de 1,5 lt de agua y luego se suspende en 500 ml de acetona. Mientras se agita se reduce el pH a 3,6 durante 3 hr mediante el agregado de ácido clorhídrico 6 N, después de lo cual se separa por filtración la resina y se lava con acetona (2 X 100 ml).

510.

El filtrado y lavado combinados contienen 375 mg del Antibiótico ZN-6, lo cual corresponde a 57 % de la cantidad que está presente en el caldo.

515.

#### EJEMPLO IX



Recuperación del Antibiótico NZ-6 a partir del caldo de fermentación

Se agita 1 lt de un caldo clarificado que contione 500 mg del Antibiótico ZN-6 durante 1 hr con 5 g de carbón decolorante (S.E.C.A. III). Después de filtración, se analiza el filtrado y se comprueba que contiene 520. menos de 25 mg del Antibiótico ZN-6. Se lava la torta de filtro con agua y luego se somete a reflujo con 100 ml de metanol durante 2 hr, se enfría y se filtra. El filtrado contiene aproximadamente 150 mg del Antibiótico ZN-6.



NOTA

525. La Patente de Invención que se solicita en España por veinte años, según la vigente Legislación, con prioridades de las patentes inglesas nº 32.479/1960, de 21 Septiembre 1960 y nº 21.721/1961, de fecha 15 de Junio 1961, a nombre de Knud Abilgaard, cuyo Nombre Comercial es Løvens Kemis  
530. ke Fabrik ved A.Kongsted, deberá recaer sobre: "METODO PARA PRODUCIR UN NUEVO ANTIBIOTICO", según las siguientes,

REIVINDICACIONES

1ª.- Metodo para producir un nuevo antibiótico hasta ahora desconocido que se denomina Antibiótico ZN-6 o  
535. sus sales, caracterizado por el hecho de hacer crecer el hongo Fusidium coccineum Fuck K. Tubaki bajo condiciones aeróbicas en un medio de fermentación que contiene carbohidratos, fuentes de nitrógeno y cantidades apropiadas de las sales inorgánicas y otras sustancias que son necesarias para la nutrición  
540. del hongo, y se continúa la fermentación hasta que se haya comunicado una sustancial actividad antibiótica a dicha solución, después de lo cual se recupera el Antibiótico ZN-6, así producido, se le concentra y se le aísla bajo forma pura o se le convierte a una de sus sales mediante reacciones conocidas.  
545.

2ª.- Método para producir un nuevo antibiótico, según la 1ª reivindicación, caracterizado porque la fuente de nitrógeno está constituida por uno o más miembros de los grupos que consisten en licor de maceración de maíz, harina de soya,  
550. carne y harina de huesos, y en que se lleva a cabo la fermentación bajo condición sumergida a una temperatura sustancialmente comprendida entre 20 y 30°C y durante un período de tiempo comprendido entre 2 y 7 días.



70607

555. 3<sup>a</sup>.- Método para producir un nuevo antibiótico, según anteriores reivindicaciones, caracterizado porque el Antibiótico ZN-6, que se produce cultivando el hongo, es recuperado poniendo íntimamente en contacto el medio con un agente absorbente elegido del grupo que consiste en carbón activo y resinas intercambiadoras de iones, separando el agente absorbente con respecto al medio, eluyendo el Antibiótico ZN-6 y aislando la sustancia con respecto al eluato.
560. 4<sup>a</sup>.- Método para producir un nuevo antibiótico, según reivindicaciones 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup>, caracterizado porque el Antibiótico ZN-6, que se produce cultivando el hongo, es recuperado del medio del cultivo extractando el medio a un valor de pH inferior a 7,0 mediante un solvente inmiscible en agua para el antibiótico ZN-6, con respecto al cual se le aísla.
565. 5<sup>a</sup>.- Método para producir un nuevo antibiótico, según reivindicación 4<sup>a</sup>, caracterizado porque se extrae la fase que contiene el Antibiótico ZN-6, inmiscible en agua, mediante un medio alcalino acuoso obteniéndose así una solución acuosa de una sal de antibiótico a partir de la cual puede aislarse la sal o se puede precipitar el Antibiótico ZN-6 acidificando la solución.
570. 6<sup>a</sup>.- Método para producir un nuevo antibiótico, según reivindicación 5<sup>a</sup>, caracterizado porque se agrega benceno a la solución acuosa de una sal de Antibiótico ZN-6, por lo menos en cantidades suficientes para formar el solvato en benceno del Antibiótico ZN-6 contenido en la misma, después de lo cual se acidifica la mezcla para precipitar el solvato en benceno del Antibiótico ZN-6, al cual se separa y, si así fuera conveniente, se convierte al Antibiótico ZN-6 o una sal del mismo.
575. 580.



270607

585.

78.- Método para producir un nuevo antibiótico, según reivindicaciones 3, 4 y 5, caracterizado porque se recristaliza la fracción cruda aislada de Antibiótico 2N-6 a partir de un solvente capaz de formar solvatos con la sustancia, después de lo cual se aísla el solvato de Antibiótico 2N-6 precipitado y, si así fuera conveniente, se le convierte al Antibiótico 2N-6 o una sal del mismo.

590.

88.- "MÉTODO PARA PRODUCIR UN NUEVO ANTIBIOTICO".

Según queda sustancialmente descrito en la presente memoria que consta de veinticinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

595.

Madrid, 19 SEP. 1961

LÖVENS KEMISKE FABRIK VID.  
A. KONGSLED  
P.P.

FRANCISCO GARCIA CABRERIZO  
P.P.