

320941

PATENTE DE INVENCIÓN

Ref: Order No. 402.



Memoria Descriptiva
sobre

"Procedimiento para la producción de un
antibiótico antiprotozoario y antihelmíntico".

=====

Solicitante: HINDUSTAN ANTIBIOTICS LIMITED, entidad de la India,
residente en Pimpri, Poona 18, Maharashtra, India.

=====

La presente invención se relaciona con un
nuevo antibiótico antihelmíntico y antiprotozoario
que se denominará en adelante "Antiamoebin", y con
un procedimiento para su producción.

5. En los años recientes se han dado a conocer

320941

- 2 -



5. varios antibióticos antiprotozoarios, tales como Paramomycin, Antiprotozooin, Hamycin, Puromycin, Afzalomycin-F, etc., especialmente para su empleo contra la Entamoeba histolytica, Trypanosoma curzili, Trichomonas vaginalis y otros protozoarios causantes de enfermedades en seres humanos y en animales. Contra la E. histolytica, que causa la disentería amébrica en los trópicos, continúa todavía la búsqueda de un amebicida eficaz que cure las infecciones hepáticas e intestinales y al mismo tiempo sea atóxico. La Paramomycin solo controla las infecciones intestinales, y otros productos químicos como el hidrocioruro de emetina, arsenicales, glucarubina, camoquina y otros necesitan un tratamiento a largo plazo y ejercen efectos secundarios adversos. Ninguno de estos antibióticos y productos químicos antiprotozoarios mencionados poseen propiedades antihelmínticas.
- 10.
- 15.

20. Los tipos de gusanos que infestan al hombre y a los animales, particularmente en los trópicos, son demasiado numerosos para mencionarse por sus nombres. Los gusanos presentes en los intestinos y otros órganos profundamente asentados son los causantes de la nutrición defectuosa y otras diversas enfermedades. Los gusanos redondos, lombrices intestinales y nematodos filiformes reducen el desarrollo de los niños por densa infestación en los intestinos. Los gusanos de los géneros Uncinaria y Anchylostoma y las tenias y otros causan perturbaciones crónicas y particularmente los primeros causan anemia en los campesinos desnutridos. Los
- 25.
30. gusanos de animales de granja, animales domésticos y



aves ascienden a varias docenas de especies y géneros y su adecuado control es uno de los mayores problemas. Existen algunos antibióticos como el Hygromycin y el Anthelomycin, que son conocidos como antihelmínticos.

5. La Ascaricidin, notificada desde Japón, es conocida como poseedora de cierta actividad antihelmíntica. Los tratamientos actuales de seres humanos y animales, encaminados a expulsar los gusanos, son diversos. Se administran sales de piperizina para expulsar gusanos redondos y las lombrices intestinales. Las sales befénicas se administran para las tenias, los compuestos tetracloroetilénicos y organofosfóricos contra los gusanos de los géneros Uncinaria y Anchylostoma, etc. Estos son compuestos tóxicos y los efectos posteriores son muy severos. A falta de drogas mejores y más seguras, han de administrarse éstas. Ninguna de ella es sistémicamente efectiva, de manera que hasta ahora no existe ningún antibiótico ni producto químico que controle la fase microscópica del Toxocara y los gusanos adultos de la filarías.
- 10.
- 15.
- 20.

En el curso del programa destinado a desarrollar nuevos antibióticos antiprotozoarios y antihelmínticos en los Research Laboratories del Industan Antibiotics Research Centre, de Pimpri (Poona), se ha descubierto un nuevo antibiótico, el "Antiamoebin", procedente de tres especies de hongos en grandes cantidades. Estos son el Emericellopsis salmosynnemata Mathur y Thirumalachar, Emericellopsis poonensis Thirumalachar y Cephalosporium pimprina Thirumalachar.

- 25.
30. Se ha observado también la producción de pequeñas

320941 - 4 -



- cantidades del antibiótico por razas de *Emericellopsis humicola* (Cain) Cain (*E. humicol* (Cain) Gilman) y *E. Minima* Stolk. Es bien sabido que la *Emericellopsis* es la fase perfecta del género imperfecto *Cephalosporium*.
5. Nosotros hemos publicado un informe sobre el hongo *E. synnematicola* Mathur y Thirumalachar, en *Mycologia*, Volumen 52, páginas 694-697, 1960. El *E. poonensis* difiere del *E. synnematicola* en la producción de la fase *Cephalosporium* para sus conidios, a diferencia del tipo
10. *Stilbum* de conidióforos en el *E. synnematicola*. Los tamaños de las esporas son también ligeramente diferentes. El *Cephalosporium pimprina* Thirum pertenece al grupo Curtipes del *Cephalosporium* descrito por Sukapure y Thirumalachar (*Mycologia*, en prensa). No produce la fase peritencial y las colonias son blancas y extendidas.
15. Los conidióforos miden de 20 a 30 micras y los conidios miden de 8 a 10 por 4 a 6 micras, son entre ovalados y elipsoides, hialinos y lisos.
20. Respecto al nuevo procedimiento en cuestión, esta invención comprende el proceso fermentativo de desarrollo de una de las tres especies de hongos anteriormente mencionados y también razas seleccionadas de *E. humicola* y *E. minima*, en un medio de cultivo que contiene una fuente asimilable de hidrato de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. Sin embargo, por economía de producción,
25. máxima producción de antibióticos y facilidad de aislamiento del Antiamoebin, son preferibles ciertos medios de cultivo. Así, por ejemplo, las fuentes actualmente preferidas de hidrato de carbono en el medio de cultivo
30. son la glucosa, sacarosa y fécula. Otras fuentes que



- pueden incluirse son la dextrina, melaza, lactosa, etc. Las fuentes de nitrógeno que pueden emplearse son el licor de destilación de maíz, haba de soja y harina de cacahuate, varias legumbres, solubles de destiladores,
5. mezclas de caseína y aminoácidos, peptonas (tanto de carne como de soja), etc. Fuentes inorgánicas de nitrógeno incluyen a las sales nitratos y sales amónicas. Las sales inorgánicas nutrientes a incorporar en el medio incluyen las sales habituales capaces de producir iones
10. de sodio, potasio, calcio, fosfato, cloruro, sulfato y similares.

- Los elementos esenciales menores que estimulan el desarrollo del hongo, dando superiores producciones, se incorporan también en el medio de cultivo. Tales elementos menores forman frecuentemente parte de las materias primas presentándose como impurezas.
- 15.

- Para describir los procesos implicados en la producción de la Antiamoebin, se describe la manipulación de la raza de *Emericellopsis poonensis* y pueden obtenerse los mismos resultados con otras especies y razas anteriormente mencionadas. La *E. poonensis*, raza SLA-I, puede desarrollarse en agar que contenga varios nutrientes a temperaturas de 24 a 37°C aproximadamente, siendo la temperatura óptima de 28°C. El agar de dextrosa de patata, agar de Sabouraud, el agar de peptona de glucosa, y el agar de Czapeks, son todos ellos adecuados. El hongo se desarrolla en forma de colonia
20. blanca, formando micelio aéreo y un mayor número de masas conidias esféricas incluidas en el conidióforo, típico del *Cephalosporium*. Después de su incubación duran
- 25.
- 30.

320941⁶

18 DIC 1955



5. te 10 a 16 días, aparecen puntos negros diseminados sobre la colocolia. Estas son la fase ascigera o fase perfecta del hongo que se adapta a la fase Emericellopsis. Para la producción del antibiótico, son adecuadas las colonias de 6 a 8 días, conteniendo numerosas masas conidias.

10. Para la preparación de cantidades limitadas de los antibióticos, pueden emplearse matraces agitadores y cultivos superficiales en frascos. Para una producción a gran escala, se emplean fermentadores de acero inoxidable con dispositivos de aireación y agitación, control de temperatura y otros destinados a mantener unas condiciones estériles. El método preferido de producción consiste en desarrollar el inóculo vegetativo del hongo en un recipiente semillero inoculándolo con un cultivo puro, empleando conidias, ascosporas, micelios o una combinación de ellos.

15. Cuando ha tenido lugar el desarrollo vegetativo con micelio joven y en desarrollo activo, se transfiere el inóculo asépticamente a grandes tanques. El medio en el que se desarrolla el inóculo vegetativo puede ser igual o diferente al empleado para la producción del antibiótico.

20.

25. Como es habitual en la producción de antibióticos mediante el procedimiento de cultivo sumergido, se insufla aire estéril a través del medio de cultivo, que se dispersa por agitación. El volumen de aire pasado varía entre 0,1 y 1 volúmenes por minuto, por volumen de caldo de cultivo, El pH inicial del medio puede ser de 4 a 7,5, aunque el valor preferido es de 6,5, y se emplea una temperatura de 24 a 28°C. La fermentación se efectúa durante 72 a 120 horas y al término de la fermentación el pH se eleva al lado alcalino.

30.



- La producción del antibiótico se sigue recogiendo una cantidad conocida del caldo y añadiendo medio volumen de n-butanol, agitando minuciosamente para la extracción, separando el butanol por centrifugación y evaporando el butanol bajo vacío. El residuo vuelve a extraerse con metanol y se filtra. La solución se evapora hasta su secamiento y se calcula la cantidad de antibiótico que queda. Este procedimiento gravimétrico proporciona resultados satisfactorios y produce una cantidad del 85 al 90% del antibiótico en el caldo. En general, la producción máxima del antibiótico después de la inoculación del medio de cultivo tiene lugar en 3 a 5 días cuando se emplea el desarrollo sumergido, y de 8 a 15 días cuando se efectúa el cultivo superficial.
- El antibiótico producido en esta invención puede recuperarse del medio de cultivo mediante técnicas de extracción y adsorción. Las primeras son las preferidas para una producción comercial, puesto que la cantidad recuperada y las eficiencias son superiores. Para la extracción del compuesto antibiótico del filtrado del caldo, son preferibles unos disolventes orgánicos polares e inmiscuibles con agua, y para extraer del micelio pueden emplearse alcoholes alifáticos como el metanol, etanol, butanol, propanol, isopropanol, cellosolve metílico y etílico, acetona acuosa, etc. El método preferido de extracción es la filtración del caldo y la extracción del filtrado y del micelio separadamente. Del micelio puede extraerse el antibiótico en todos los alcoholes inferiores tales como metanol y etanol, isopropanol, acetona acuosa, cellosolve metílico, piridina, formamida
- 5.
 - 10.
 - 14.
 - 20.
 - 25.
 - 30.

32094-1



dimetflica, cellosolve metflico y etflico, y otros.

El antibi6tico que se recupera en el disolvente org6nico puede evaporarse hasta su secamiento en vacio, para producir el antibi6tico en forma cruda.

5. Como variante, el antibi6tico puede adsorberse empleando carb6n vegetal activado, silicato magn6sico-alumini-
co y similares. La eluci6n del antibi6tico es solo parcial por disolventes org6nicos en los que el antibi6tico sea soluble.

10. Cuando solo se efectua el proceso de extracci6n que es el preferido, el caldo es filtrado y el filtrado se extracta con un tercio de volumen de n-butanol.

15. El butanol se separa y se concentra en vacio a 1/20 de volumen y se precipita el antibi6tico empleando un disolvente mezclable tal como acetona o una mezcla de disolventes mezclables, como acetina y 6ter de petr6leo. El antibi6tico crudo se recoge para su ulterior purificaci6n. El micelio puede extractarse dos veces con n-butanol y puede efectuarse el mismo procedimiento descrito para el filtrado. Sin embargo, el proceso preferido es la extracci6n del micelio en metanol o etanol, filtr6ndose luego. El extracto metan6lico o etan6lico se trata con carbono decolorante y se evapora hasta separarse el alcohol. Ordinariamente queda el

20. antibi6tico en forma de suspensi6n blanca, principalmente en condici6n cristalina. Los cristales crudos se retiran por filtraci6n y se recristalizan para su ulterior purificaci6n.

30. Para la purificaci6n del Antiamoebin crudo o parcialmente purificado, se disuelve el material en



5. un 30 a un 45 % de etanol o metanol caliente, se trata con carbón vegetal activado decolorante, se filtra mientras está todavía caliente, se enfría a temperatura ambiente y se mantiene durante 4 a 6 horas, transfiriéndose luego a un ambiente frío a 5°C durante toda la noche. Se forman grandes masas de cristales de forma acicular, que son filtrados, lavados con agua minuciosamente y secados. El antibiótico Antiamoebin tiene las siguientes características:

Naturaleza:	Polipéptico neutro
Forma y color:	Agujas fasciculadas blancas, ligeramente amargas e inodoras.
Punto de fusión:	219-220°C (d)
Actividad óptica:	(α) $D^{25} +10$ (C, 1,02% en metanol) (α) $D^{25} +10$ (C, 1,03% en DMF)
Máximo de absorción ultravioleta.	Absorción terminal
Máximo de absorción infrarroja.	3.320-3.290 (NH ligado). 1650, 1530 (deformación CO y NH), 1078, 695 CM^{-1} .
Solubilidad:	Soluble en metanol, etanol, butanol, n-propanol, isopropanol, piridina, ácido acético glacial, formamida dimetilica, acetona acuosa, cetona metil-etilica húmeda y cello-solve metilico y etilico. Insoluble en agua, cloroformo, éter, éter de petróleo, ace-

320941

- 10 -

18 DIC 1968



tato etílico, acetato butílico, acetona, tolueno, tetracloruro de carbono, dioxano, benceno, disulfuro de carbono, tolueno, cloruro metílico y glicol etilénico.

Naturaleza:

Polipéptido neutro.

Otras reacciones:

Ensayos negativos con cloruro férrico de Fehling, Benedict, Molisch, Sakaguchi, ninhidrina, biuret y antrona. Ensayo positivo con xantoproteína. Hidrólisis alcalina durante una hora produce un ensayo positivo con biuret. La hidrólisis con ClH 6N en un tubo sellado durante 16 horas produce 11 manchas positivas de ninhidrina en cromatografía en papel bidimensional. Los siguientes aminoácidos son identificados por cromatografía en papel monodimensional o bidimensional con ayuda de aminoácidos normales: prolina, ácido alfa-aminoisobutírico, fenilalanina, valina, leucina, hidroxiprolina, lisina y ácido glutámico. Análisis: C, 56,11, H, 7,56; N, 13,56%. El ensayo de Assigne para halógeno y azufre es negativo.



- Los espectros ultravioleta e infrarrojo del Antiamoebin en Nujol se indican en los adjuntos dibujos, en los cuales la figura 1 ilustra el espectro ultravioleta y las figuras 2 y 3 ilustran los espectros infrarrojos para dos diferentes regiones.
- 5.

EJEMPLO 1

Preparación de Antiamoebin.

- Se prepara un caldo de inóculo que tiene las siguientes composiciones: 2,0% de harina de haba de soja, 2,0% de glucosa, 0,3% de sulfato amónico, 0,25% de cloruro sódico y 0,6% de carbonato cálcico; el pH es de 6,5 a 7. El medio, de 50 litros, se esteriliza a 15 libras durante 30 minutos y se inocula cuando se enfría a 28°C con desarrollo vegetativo de 48 horas de *Emeri-*
10. *cellopsis synnematicola* o *E. poonensis*. El inóculo a emplear se desarrolla previamente en matraces agitables y se observa al microscopio para comprobar su vigoroso desarrollo. Durante el periodo de desarrollo en el medio de 50 litros, se efectúan aireación y agitación, realizándose estas operaciones bajo condiciones estériles.
15. Se emplea medio volumen de aire por volumen de caldo de cultivo por minuto.
- 20.

- Este inóculo, después de un desarrollo de 48 horas, se transfiere a un tanque de fermentación con 1000 litros de medio, de la siguiente composición: 2,5% de harina de haba de soja, 3,0% de glucosa, 0,5% de sulfato amónico, 0,25% de cloruro sódico y 0,5% de carbonato cálcico; el pH es de 6,5 a 6,8.
- 25.

- El medio se esteriliza calentando bajo presión a 120°C aproximadamente, durante 30 minutos. La tempe-
- 30.

320941

- 12 -

78 DIC 1965



- ratura se desciende a 28°C y el inóculo de 50 litros del recipiente de semilla se transfiere asépticamente. Durante el período de desarrollo, se agita el caldo y se insufla aire estéril a razón de 0,5 a 1 volumen de aire por volumen de caldo por minuto. El desarrollo
5. del micelio y la producción de antibiótico se comprueba periódicamente por el método gravimétrico. Al cabo de 96 a 120 horas, que es el período habitual requerido, se ajusta el pH del caldo a 5 y se filtra, El filtrado es recogido y extractado con $1/3$ de volumen de n-butanol empleando un extractor para mezclar minuciosamente y transferir el antibiótico desde el caldo al disolvente. El micelio se extrae también análogamente primero con 1,5 volúmenes de butanol por kg del micelio, efectuándose una segunda extracción con un litro de butanol por kg de micelio. Después de una minuciosa extracción por agitación, se filtra el butanol y se agrupa. Este se mezcla con la extracción butanólica del filtrado del caldo. Los extractos butanólicos agrupados reciben un lavado con agua para la separación de sales, etc., concentrándose luego en vacío a 30 litros aproximadamente. El volumen de solución butanólica agrupada es, para empezar, de 600 litros aproximadamente. Se forma una gran cantidad de suspensión, que es el antibiótico crudo. Este es filtrado, lavado con acetona y secado. Para la solución butanólica después de la filtración de la suspensión, se añade 3 veces la cantidad de acetona y se mantiene enfriada la solución durante 24 horas a 10°C . El precipitado amarillo crema es filtrado, lavado con acetona y secado.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



El Antiamoebin crudo así obtenido es lavado con varios cambios de agua hasta que no se forma ningún material colorante amarillo pálido y se disuelve en metanol caliente al 45%, mantenido a 50°C sobre un baño de agua. Se añade un exceso de Antiamoebin hasta que no se disuelve ya. Se agrega carbón vegetal activado (1% de extracto metanólico) y se filtra mientras está todavía caliente. Luego se mantiene la solución a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas y seguidamente se transfiere a un ambiente frío, donde se deja a 5°C durante toda la noche. Se forman grandes masas de cristales aciculares en haces y se filtran, lavan con agua destilada y secan. Puede efectuarse una segunda recristalización repitiendo el mismo procedimiento.

15.

EJEMPLO 2

El proceso de fermentación se lleva a cabo de igual manera. El micelio que contiene la porción principal del antibiótico se filtra ajustando el pH del caldo en 5. El micelio es lavado y extractado con metanol, usando 1,5 litros de metanol por kg de micelio para la primera extracción y un litro de metanol por kg de micelio en la segunda extracción. El metanol se filtra y se agrupan los extractos. El extracto agrupado se trata con carbón vegetal activado (decolorante) a razón del 0,5% y se filtra. Luego se evapora el extracto en vacío a una temperatura de 45 a 50°C. Esto es posible debido a la presencia de agua en el extracto metanólico. El volumen de 600 litros de extracto metanólico se reduce a 30 litros. Se forma Antiamoebin en forma de suspensión blanca, que es en su mayor parte cristalina. Los cristales

320941¹⁴ -



5. les crudos son filtrados, lavados con agua y secados. Se disuelven estos cristales en un 45% de metanol o etanol, se tratan con carbón vegetal, se filtran y se recristalizan siguiendo el mismo procedimiento indicado en el ejemplo 1.

10. El filtrado del caldo se trata con carbono activado (Norit SG) en una proporción de 2 gramos por litro de caldo. El carbono activado es agitado y filtrado. Se efectúa la elusión del antibiótico usando butanol, metanol o etanol. El producto de la elusión se evapora hasta su secamiento y se purifica el Antiamocin mediante recristalización a partir de este material sólido crudo.

EJEMPLO 3

15. Se lleva a cabo el proceso de fermentación de la manera descrita en los ejemplos 1 y 2 y se extrae el micelio con cellosolve etílico o metílico y se concentra el extracto para obtener el antibiótico crudo. Este es ulteriormente elaborado y purificado para obtener un material cristalino puro.

EJEMPLO 4

25. El proceso de fermentación se lleva a cabo de la manera descrita en los ejemplos 1 y 2 y se extrae el micelio con acetona acuosa o formamida dimetilica, concentrándose el extracto para dar un antibiótico crudo, que es purificado y cristalizado.

EJEMPLO 5

30. El proceso de fermentación se lleva a cabo de la manera descrita en los ejemplos 1 a 2 y se extrae el micelio en alcohol amilo o ciclohexanol caliente y se



concentra para obtener el antibiótico crudo.

5. La actividad del producto final se determina por método de bioensayo para determinar la actividad antiprotozoaria, usando *Tetrahymena pyriformis* y *Entamoeba histolytica*. En el bioensayo se usa la *Tetrahymena pyriformis*.

10. Se efectúan cultivos del *Tetrahymena pyriformis* mantenidos con decocción de extracto de tierra y harina de cacahuate. Se retira material de Antiamoebin standard y se obtiene una solución acuosa de un miligramo por milímetro. El antibiótico ha de solubilizarse primeramente en algunas gotas de etanol. Se introducen en tubos cantidades iguales del cultivo líquido de *Tetrahymena* que contiene 2×10^4 células por ml y mediante el método de dilución seriada en tubos, se obtiene una concentración del antibiótico entre 1 microgramo por ml y 100 microgramos por ml en la gama de 1-10-20-30-40 microgramos por ml, etc. Después de un mezclado íntimo y de una incubación durante una hora
15. a 24°C , se examina al microscopio la solución de cada tubo. Se determina la concentración en la que hay un 100% de lisis de las células. En la siguiente serie, se efectuaron diluciones entre la concentración a la que se observó una lisis del 100% y la siguiente concentración inferior, determinándose la concentración mas próxima que produjo una lisis del 100% en 60 minutos.
20. Para el Antiamoebin puro, la concentración para la lisis es de 46 a 48 microgramos por mililitro.

25. Se emplea la raza de *E. histolytica* (hyman) mantenida en el laboratorio. Las amebas se desarrollan en
- 30.

320941

- 16 -

18 DIC 1953



- un medio de Balamuth totalmente líquido y se recogieron los cultivos de 48 horas incubados a 37°C. Las amebas se recogieron y mezclaron con medio de Balamuth fresco conteniendo fécula de arroz. Se ajusta el número de amebas en este proceso de dilución disponiendo
5. aproximadamente 5 amebas movibles por 0,05 ml. Se efectúa la solución de Antiamoebin empleando el mismo medio como vehículo. Se solubiliza primeramente en algunas gotas de etanol. El medio de Balamuth que contiene
10. a los trofofitos se distribuye en tubos y se añade al antibiótico para obtener la concentración final requerida, incubándose a 37°C durante 48 horas, al cabo de cuyo tiempo se efectúan lecturas observando al microscopio para determinar la existancia de trofofitos activos.
15. La observación se efectúa después de 48 horas de incubación a 37°C., con los siguientes resultados:

<u>Control (sin antibiótico)</u>	<u>Mas de 25 trofofitos movibles por campo.</u>
1/100 mg/ml.	Lisis completa, sin amebas.
1/200 mg/ml.	Igual
1/300 mg/ml.	Igual
1/400 mg/ml.	Igual
1/500 mg/ml.	Igual
1/600 y 1/900 mg/ml.	Igual. Una o raramente dos amebas a 1/900 mg/ml.
1/1000 mg/ml.	Una o dos amebas movibles activadas en 0,05 ml.
1/2000 mg/ml.	Desarrollo raro, una a dos amebas por 0,05 ml.



1/2500 mg/ml.	Dos a cinco amebas por 0,05 ml.
1/5000 mg/ml.	Mas de 10 amebas por 0,05 ml.
1/10.000 mg/ml.	Mas de 10 amebas por 0,05 ml.

- La actividad amebicida del Antiamoebin es por consiguiente de 0,5 a 1,25 microgramos por ml. La actividad de muestras desconocidas puede determinarse por el mismo procedimiento. El antibiótico es atóxico oralmente y se tolera bien una cantidad de 10 gramos por kg de peso del cuerpo en ratones, ratas, cerdos de guinea, perros, etc. La dosis terapéutica para curar infecciones protozoarias y helmínticas en el hombre y en los animales es una dosis oral de solo 5 mg por kg de peso del cuerpo, siendo el periodo de tratamiento inferior a 5 días para una cura completa. Por consiguiente, queda bien establecido el efecto terapéutico de este antibiótico.

NOTA

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental, siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN ANTIPIROTOZOARIO Y ANTIHELMINTICO"; caracterizándose por lo siguiente:

320941-18-



48 DIC 1965

5 . 1ª.- "Procedimiento para la producción de un antibiótico antiprotozoario y antihelmíntico", caracterizado porque se cultiva una raza de *Emericellopsis* o *Cephalosporium*, particularmente *E. synnematicola*, *Cephalosporium pimprina* y razas de otros *Emericellopsis*, tales como el *E. minima* y el *E. humicola* y sus fases conidias, en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, hasta que se produce una cantidad sustancial del antibiótico en el cultivo del caldo, y uteriormente la recuperación del antibiótico del citado medio de cultivo.

15 . 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo contiene hidratos de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas asimilables y el organismo productor se cultiva en aquel bajo condiciones aeróbicas mediante cultivo sumergido.

20 . 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el organismo es *Emericellopsis synnematicola*, *E. ponnensis*, *E. humicola*, *E. minima* o sus fases conidias y el *Cephalosporium pimprina*.

4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el medio de cultivo se mantiene a una temperatura de 20 a 37°C aproximadamente.

25 . 5ª.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el desarrollo del organismo se lleva a cabo durante un período de 2 a 8 días.

30 . 6ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se incluye la operación de extraer el caldo de cultivo a cual-

320941 - 19 -

18 DIC



quier pH con disolventes orgánicos polares inmezclables con agua y alcoholes alifáticos C₁ a C₈.

5. 7^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque incluye la operación de extraer el caldo de cultivo a cualquier pH con éteres monoalquílicos alifáticos de glicol etilénico C₃ a C₆.

10. 8^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el caldo de cultivo a cualquier pH se extrae a bajas o elevadas temperaturas con cetonas alifáticas C₃ a C₁₀.

9^a.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el micelio se extrae con formamida dimetílica.

15. 10^a.- "Procedimiento para la producción de un antibiótico antiprotozoario y antihelmíntico", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria; e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta Memoria consta de 19 hojas escritas a máquina por una sola cara.

20.

Madrid 18 DIC 1965
HINDUSTAN ANTIBIOTIC LIMITED
J. GOMEZ ACEBO Y MODET
Firmas: F. Hernández Ruiz

ESCALA
VARIABLE

18 DIC 1968

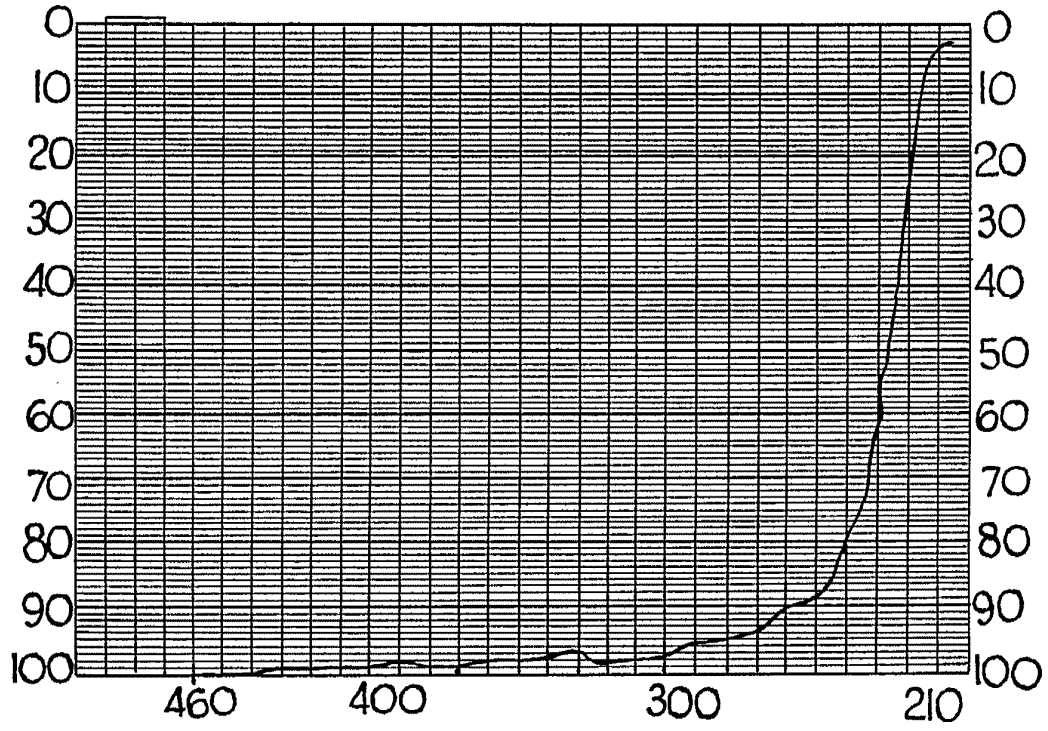


FIG-1

Madrid 18 DIC 1968
I. GÓMEZ ACIBO Y MOJER
p. p. Firmado: F. Hernández Ruiz

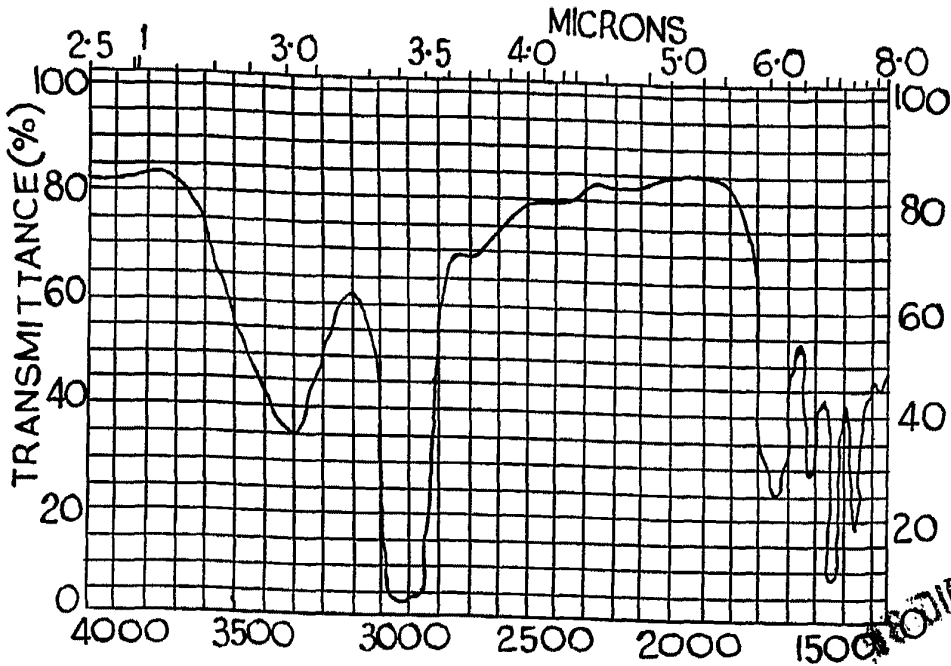
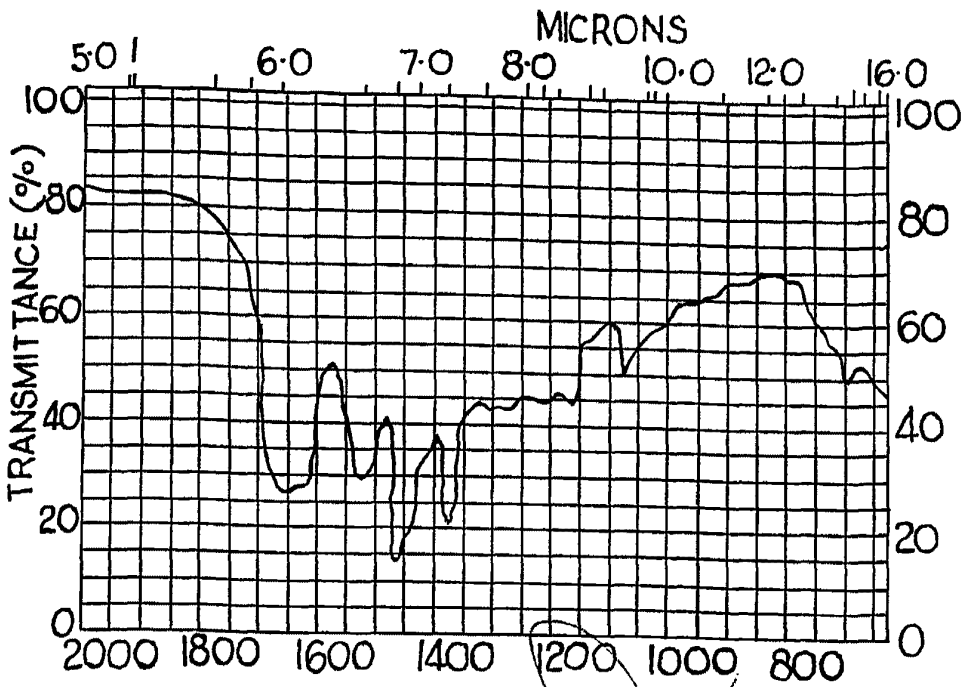


FIG. 2



ESCALA VARIABLE

FIG. 3

18 DIC 1965

[Signature]

J. GOMEZ ACERO Y MOJER
P. Firmado: J. Hernandez Sult.