



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

Nº 895.374

Classif. internat. :

Mis en lecture le:

15 -04- 1983

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention :

~~XX~~

Vu le procès-verbal dressé le 16 décembre 1982 à 15 h. 10
au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. — *Il est délivré à la Sté dite : FARMITALIA CARLO ERBA*
S.P.A.
Via Carlo Imbonati 24, I-20159 Milan (Italie)

repr. par l'Office Parette (Fred. Maes) à Bruxelles,

un brevet d'invention pour : Nouvel agent antitumeur obtenu par réduction microbienne stéréosélective de la 4-déméthoxydaunorubicine, (Inv. : G. Cassinelli, S. Merli et S. Penco)

Article 2. — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 14 janvier 1983

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

Le Directeur

J. D. Galt

L. SALPETEUR

85374

Br/4976.

Case FC 133.

MEMOIRE DESCRIPTIF

à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

pour

"Nouvel agent antitumeur obtenu par réduction micro-
bienne stéréosélective de la 4-déméthoxydaunorubicine"

par

la Société : FARMITALIA CARLO ERBA S.p.A.,
Via Carlo Imbonati, 24,
I - 20159 MILAN (Italie)-

Inventeurs : Giuseppe CASSINELLI, Sergio MERLI et
Sergio PENCO.

8

Nouvel agent antitumeur obtenu par réduction micro-
bienne stéréosélective de la 4-déméthoxydaunorubicine.

La présente invention concerne un procédé
selon lequel des micro-organismes appartenant aux
5 genres Streptomyces, Corynebacterium et Mycobacterium
sont utilisés pour une réduction stéréosélective du
groupe fonctionnel 13-cétone de la 4-déméthoxydauno-
rubicine (I) pour obtenir spécifiquement une des deux
4-déméthoxy-13-dihydrodaunorubicines stéréoisomères
10 en C-13 possibles. Le nouveau composé (II) désigné
ci-après par l'expression "FCE 22723", est utile comme
agent antitumeur et il exerce, sur des tumeurs expéri-
mentales, une activité comparable à celle de la 4-
déméthoxydaunorubicine (I). Le substrat pour la ré-
15 duction microbienne stéréosélective est un analogue
synthétique de la daunorubicine qui a été décrit dans
le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 4.046.878 de la
Demanderesse (6 septembre 1977).

Une réduction non-stéréosélective du groupe
20 fonctionnel 13-cétone de la 4-déméthoxydaunorubicine
(I) en vue d'obtenir un mélange des deux alcools sté-
réoisomères en C-13 est décrite dans la demande de
brevet britannique n° 82/11692 de la Demanderesse
(déposée le 22 avril 1982).

25 Plus particulièrement, la présente invention
concerne un procédé de biosynthèse selon lequel
Corynebacterium mediolanum, souche ATCC 14004, Myco-
bacterium fortuitum, souche NRRL B-8119 et un nouveau
mutant de l'espèce Streptomyces peucetius, souche
30 M 87 F.I. déposée à la "Deutsche Sammlung für Micro-
organismen" où elle est enregistrée sous le numéro
matricule DSM 2444, sont caractérisés par leur aptitu-
de à réduire de manière stéréosélective le groupe
fonctionnel 13-cétone de la 4-déméthoxydaunorubicine
35 (I) et à accumuler le nouveau composé FCE 22723 (II)

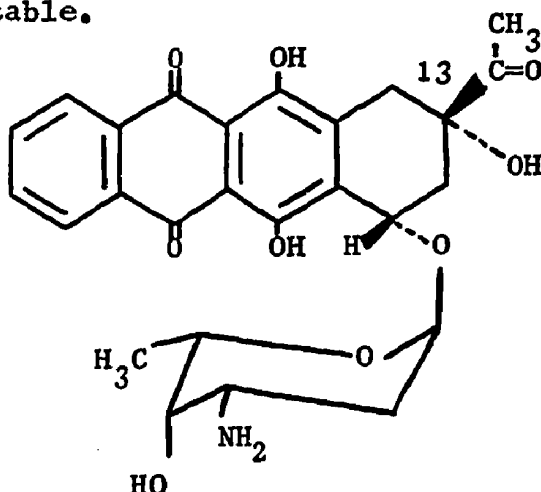
dans des bouillons de fermentation.

La présente invention concerne des procédés ayant pour but de récupérer le composé FCE 22723 (II) de bouillons de fermentation, de le concentrer en solution brute et de le purifier.

Le cadre de la présente invention englobe la nouvelle anthracycline antitumeur FCE 22723 (II) obtenue à l'état pur et sous forme de son chlorhydrate par les procédés de biosynthèse.

L'invention fournit également une composition pharmaceutique comprenant le composé II ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables en mélange avec un support ou un diluant pharmaceutiquement acceptable.

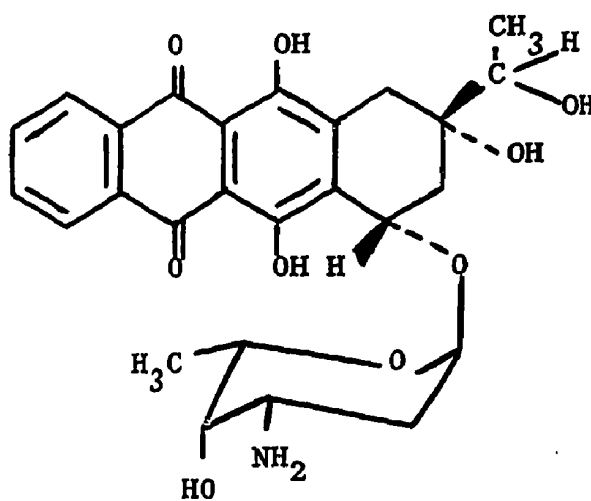
15



20

I

25



30

II

35

8

Un exemple spécifique est un nouveau micro-organisme mutant Streptomyces peucetius, souche M 87 F.I.

5 Des mutants qui sont caractérisés par leur aptitude à réduire de manière stéréosélective la fonction 13-cétone d'un composé I et à accumuler le nouveau composé FCE 22723 (II) dans la bière de fermentation, peuvent être obtenus par mutation de genres différents de bactéries, notamment Streptomyces.

10 Streptomyces peucetius subsp. aureus ATCC 31428 a subi une mutation comme décrit dans la présente spécification pour donner un nouveau micro-organisme de laboratoire.

15 La mutation de S. peucetius subs. aureus, ATCC 31428 en utilisant de la nitrosoguanidine a donné lieu à la formation d'un nouveau mutant qui transforme sélectivement le composé I en composé II. Ce micro-organisme mutant M 87 F.I. de S. peucetius subs. aureus a reçu le numéro matricule DSM 2444 à la "Deutsche
20 Sammlung für Microorganismen", République Fédérale d'Allemagne, où il a été déposé dans la collection permanente.

La morphologie du mutant M 87 F.I. ne peut être distinguée de celle du micro-organisme apparenté
25 S. peucetius ATCC 31428, tandis que l'on peut établir clairement une distinction dans les caractères appartenant à la culture et à la biochimie des deux cultures. En effet, le mutant M 87 F.I. ne produit pas, sur des milieux d'agar-agar, le pigment soluble jaune
30 paille à jaune citron qui caractérise son micro-organisme apparenté S. peucetius ATCC 31428.

De plus, le mutant M 87 F.I. peut transformer sélectivement le composé I en un composé II, tandis que le micro-organisme apparenté S. peucetius
35 ATCC 31428 n'est pas sélectif à cet égard. Cette pro-

8

priété du mutant M 87 F.I. le rend très utile comme décrit dans la présente spécification.

5 La transformation stéréosélective suivant la présente invention peut être effectuée dans une culture en croissance de S. peucetius M 87 F.I. en ajoutant le composé I comme substrat à la culture au cours de la période d'incubation.

10 Le composé I peut être ajouté sous forme de son chlorhydrate après solubilisation dans de l'eau distillée stérile. L'intervalle préféré (mais non limitatif) de la concentration du composé I dans la culture se situe entre environ 100 et 400 microgrammes/litre. On développe la culture dans un milieu nutritif contenant une source de carbone, par exemple, un
15 carbohydrate assimilable, ainsi qu'une source d'azote, par exemple, une matière protéique ou un composé azoté assimilable. Parmi les sources préférées de carbone, il y a le glucose, le sucrose, le glycérol, l'amidon, l'amidon de maïs, la dextrine, les mélasses et analogues.
20 Parmi les sources préférées d'azote, il y a la liqueur de macération du maïs, l'extrait de levure, la levure sèche de brasserie, la farine de soya, la farine de coton, la farine de maïs, la caséine, la farine de poisson, les produits solides de distillerie,
25 la peptone animale, l'extrait de viande, les sels d'ammonium et analogues. On peut avantageusement utiliser des combinaisons de ces sources de carbone et d'azote. Des métaux à l'état de traces, par exemple, le zinc, le magnésium, le manganèse, le cobalt,
30 le fer et analogues ne doivent pas nécessairement être ajoutés aux milieux de fermentation, car l'eau du robinet et des ingrédients non purifiés sont utilisés comme composants du milieu avant la stérilisation de ce dernier.



La durée du procédé de transformation peut se situer entre environ 72 heures et 8 jours. La température d'incubation au cours du procédé de transformation peut se situer entre environ 25°C et environ 37°C, une température de 29°C étant préférée. Les contenus des récipients de transformation sont aérés par agitation à environ 250 tours/minute ou par agitation avec de l'air stérilisé afin de faciliter la croissance du micro-organisme, améliorant ainsi l'efficacité du procédé de transformation.

On contrôle le déroulement de la réaction de transformation microbienne en prélevant des échantillons des fermentations à différents intervalles et en procédant à une extraction à un pH de 8,2 avec un mélange 9:1 de dichlorométhane et de méthanol. Lorsqu'on soumet un échantillon de l'extrait organique à une chromatographie sur couche mince en utilisant, comme éluant, un mélange 80:20:7:3 (en volume) de chloroforme, de méthanol, d'acide acétique et d'eau, on constate que le composé FCE 22723 (II) apparaît à une valeur moyenne Rf de 0,25, tandis que l'on observe l'apparition de la 4-déméthoxydaunorubicine (I) à une valeur Rf de 0,35. On peut effectuer une estimation quantitative des deux anthracyclines après la chromatographie sur couche mince en utilisant les systèmes d'élution mentionnés ci-dessus en raclant et en éluant, avec du méthanol, les zones correspondantes de couleur rouge pour procéder finalement à une détermination spectrophotométrique à 482 nm.

Les bouillons de fermentation entiers dans lesquels le composé I a été transformé en un composé FCE 22723 (II), sont filtrés à l'aide de terre d'infusoires. On extrait le gâteau mycélien de couleur orange avec un solvant organique miscible à l'eau tel que le méthanol et d'autres alcools inférieurs, le

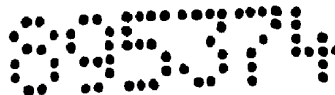
8

dioxanne, l'acétonitrile et l'acétone ; de préférence, on utilise le méthanol. On recueille les extraits mycéliens, on les concentre sous pression réduite et on les combine avec les liqueurs de fermentation filtrées, on les règle à un pH de 8,2, puis on les extrait avec un solvant organique non miscible à l'eau tel que le n-butanol, le chloroforme, le dichlorométhane ou, de préférence, un mélange 9:1 de dichlorométhane et de méthanol. Les extraits organiques contiennent le composé FCE 22723 (II) conjointement avec le composé I, ainsi que certains produits de dégradation mineurs.

On concentre l'extrait organique sous pression réduite jusqu'à siccité et l'on soumet le résidu dissous dans du dichlorométhane à une chromatographie dans une colonne de gel de silice tamponnée à un pH de 7 avec un gradient d'un mélange de dichlorométhane, de méthanol et d'eau. On élue tout d'abord le composé I avec un mélange 89,5:10:0,5, puis on élue le composé FCE 22723 (II) avec un mélange 30:5,5:0,6. A partir des fractions mises en commun, après lavage avec de l'eau, concentration à un faible volume en présence de n-propanol et après addition d'un équivalent d'acide chlorhydrique et d'un excès d'éther diéthylique, on obtient un précipité du composé pur FCE 22723 (II) sous forme de son chlorhydrate.

Sous forme d'une base libre, le composé FCE 22723 (II) est soluble dans les solvants organiques polaires et les alcools aqueux, tandis que son chlorhydrate est soluble dans l'eau et les alcools inférieurs, mais insoluble dans les solvants organiques. Le chlorhydrate du composé FCE 22723 possède les propriétés physicochimiques suivantes :
Point de fusion : 169-170°C (décomposition).
Rotation spécifique : $[\alpha]_D^{23} +177^\circ$ (c 0,05, CH₃OH).

8



Spectre d'absorption des rayons ultraviolets et visibles : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 252, 286, 482, 514 nm
($E_1^{1\%} = 730, 150, 188$ et 115).

Spectre d'absorption des rayons infrarouges (KBr) :

5 pics aux fréquences suivantes : 3400, 2970, 2930, 1620, 1585, 1500, 1475, 1430, 1410, 1375, 1340, 1310, 1280, 1230, 1200, 1110, 1080, 1065, 1000, 980, 930, 910, 890, 870, 850, 820, 785, 765, 730, 700, 450 et 430 cm^{-1} .

10 Spectre de résonance magnétique nucléaire ^{13}C : (D_2O)
à 50 MHz : 16,7 (C-14, C-6'), 28,7 (C-2'), 32,8 (C-10), 34,2 (C-8), 47,8 (C-3'), 67,2 (C-5'), 68,0 (C-4'), 70,7 (C-7), 72,6 (C-13), 73,4 (C-9), 100,1 (C-1'), 110,5 et 111,3 (C-5a, C-11a), 127,3 et 127,5 (C-1, C-4),
15 132,8 et 132,9 (C-4a, C-12a), 135,1 (C-10a), 136,2 et 136,4 (C-2, C-3), 138,0 (C-6a), 156,1 et 157,1 (C-6, C-11), 186,5 et 186,8 δ (C-5, C-12).

Formule moléculaire : $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{O}_9\text{N} \cdot \text{HCl}$

20 m/e en équivalent DF vis-à-vis de la base libre : 499 (M^+).

Un procédé de chromatographie liquide sélective sous haute pression permet de séparer les deux alcools stéréoisomères en C-13 présents dans un échantillon de 4-déméthoxy-13-dihydrodaunorubicine synthétique préparée comme décrit dans la demande de brevet britannique n° 82/11692 de la Demanderesse (déposée le 22 avril 1982), laquelle présente deux pics avec des temps de rétention de 32,7 et 34 minutes.

30 En adoptant le même procédé de chromatographie liquide sélective sous haute pression, le composé FCE 22723 (II) apparaît sous forme d'un seul pic avec un temps de rétention de 34 minutes correspondant à celui du constituant plus lent de la 4-déméthoxy-13-dihydrodaunorubicine synthétique.

8

Procédé de chromatographie liquide sélective sous haute pression

Colonne : "Lichrosorb RP 18 (5 μ) Hibar Merck".

Phase mobile A : solution aqueuse de KH_2PO_4 (10 g/l) portée à un pH de 2,6 avec de l'acide citrique 0,5M/ CH_3CN = 90/10 (en volume).

Phase mobile B : CH_3CN

Elution : isocratique pendant 40 minutes (80% A + 20% B), d'où : 20 minutes = 40% A + 60% B.

Débit : 0,6 ml/minute.

Détection : 254 nm.

Activité biologique

15 L'activité antiprolifère du composé FCE 22723 (II) a fait l'objet d'essais "in vitro" sur une formation de colonie de cellules de HeLa. Comme indiqué dans le tableau 1, le composé II a été trois fois plus puissant que la daunorubicine et aussi puissant que la 4-déméthoxydaunorubicine (I). En ce qui concerne 20 l'activité antitumeur "in vivo", le composé FCE 22723 (II) a fait l'objet d'essais contre la leucémie ascitique P388. Des souris CDF-1 ont fait l'objet d'une transplantation intrapéritonéale au moyen de 10^6 cellules/souris ; le traitement avec les composés étudiés 25 a été effectué 24 heures plus tard.

Le tableau 2 donne les résultats de deux expériences. A la dose optimale adoptée au cours des essais, le composé FCE 22723 (II) a été plus puissant 30 (environ 10 fois) que la daunorubicine et aussi puissant que la 4-déméthoxydaunorubicine (I).

L'activité antitumeur du composé II, évaluée par l'accroissement du temps de vie, était égale à celle de la daunorubicine et du composé apparenté (I) 35 à leurs doses optimales.

8

Tableau 1 : Aptitude des cellules de HeLa cultivées à former des colonies après traitement avec le composé FCE 22723 (II)¹.

5	Composé	Dose (ng/ml)	Inhibition de colonies (%)	DI ₅₀ (ng/ml)
	Daunorubicine	25	98	
		12,5	53	~12
10		6,2	3	
	4-déméthoxydauno- rubicine (I)	12,5	100	
		6,2	96	
		3,1	50	~3
15		1,5	16	
	FCE 22723 (II)	12,5	100	
		6,2	59	
		3,1	55	~4
		1,5	28	

¹ Les cellules de HeLa ont été exposées aux médicaments pendant 24 heures.

8

**Tableau 2 : Activité antitumeur du composé FCE 22723
(II) contre la leucémie ascitique P388 ¹**

	Composé	Dose (mg/kg)	Temps de survie moyen ² (%)	Toxicité Mortalité
5				
	Daunorubicine	2,9	160, 163	0/20
		4,4	140, 165	8/20
10		6,6	118, 155	10/20
	4-déméthoxydauno- rubicine (I)	0,33	145, 150	0/20
		0,5	150, 160	1/20
		0,75	122, 165	9/20
15	FCE 22723 (II)	0,14	136	0/10
		0,22	140	0/10
		0,33	140, 154	0/20
		0,5	145, 150	4/20
		0,75	113, 165	7/20

20

¹ Traitement par voie intrapéritonéale au jour 1

² Temps de survie moyen exprimé par le pourcentage de témoins non traités ; données de deux expériences.

Les exemples non limitatifs ci-après sont
25 donnés pour décrire plus en détail les procédés et le produit de la présente invention.

Exemple 1

On développe une culture de Streptomyces
peucetius, souche M 87 F.I. (DSM 2444) pendant 14
30 jours à 28°C sur des cultures inclinées d'agar-agar
comportant le milieu d'entretien suivant (milieu SA) :
3% de glucose ; 1,2% de levure sèche de brasserie ;
0,1% de NaCl ; 0,05% de KH₂PO₄ ; 0,1% de CaCO₃ ; 0,005%
de MgSO₄ ; 0,0005% de FeSO₄.7H₂O ; 0,0005% de
35 ZnSO₄.7H₂O ; 0,0005% de CuSO₄.5H₂O ; 2% d'agar-agar

g

eau du robinet : pour compléter à 100 ml ; pH : 6,7 ;
on effectue la stérilisation par chauffage à 115°C
dans un autoclave pendant 20 minutes.

On recueille les spores de la culture ainsi
5 développée et on les met en suspension dans 3 ml d'eau
distillée stérile ; on inocule cette suspension dans
des ballons Erlenmeyer de 300 ml contenant 60 ml du
milieu de croissance liquide suivant : 0,3% de levure
sèche de brasserie ; 0,5% de peptone ; 0,05% de
10 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; eau du robinet : pour compléter à
100 ml. On effectue la stérilisation par chauffage à
120°C dans un autoclave pendant 20 minutes. Après
stérilisation, le pH de ce milieu se situe entre 6,8
et 7. On agite les ballons inoculés pendant deux jours
15 à une température de 28°C sur un agitateur rotatif
fonctionnant à 250 tours/minute et décrivant un cercle
d'un diamètre de 7 cm. On inocule 1,5 ml de la culture
développée décrite ci-dessus dans des ballons Erlen-
meyer de 300 ml contenant 50 ml du milieu de transfor-
20 mation suivant : 1,5% d'extrait de levure ; 0,25% de
 KH_2PO_4 ; 1,5% de glucose ; eau du robinet : pour com-
pléter à 100 ml ; pH : 6,9 ; on effectue la stérilisa-
tion par chauffage à 115°C dans un autoclave pendant
20 minutes. On stérilise séparément la solution de
25 glucose et on l'ajoute à la concentration appropriée
dans chaque ballon stérilisé.

On incube ainsi les ballons à 28°C pendant
24 heures dans les conditions décrites pour la phase
d'ensemencement. A ce moment, dans chaque ballon, on
30 ajoute 1,25 ml d'une solution du composé I dans de
l'eau distillée stérile à une concentration de 10 mg/
ml. On incube les ballons agités pendant 2 jours sup-
plémentaires pour obtenir une transformation de 85%
du composé I en un composé II.

8

Exemple 2

On développe une culture de S. peucetius, souche M 87 F.I. sur un milieu solide comme décrit à l'exemple 1. On met en commun les spores de trois cultures inclinées et on les recueille dans 10 ml d'eau distillée stérile ; on inocule la suspension ainsi obtenue dans un ballon de 2 litres à fond rond muni de chicanes et contenant 500 ml du milieu d'ensemencement décrit à l'exemple 1. On incube le ballon pendant 48 heures sur un agitateur rotatif fonctionnant à 120 tours/minute et décrivant un cercle d'un diamètre de 7 cm à une température de 28°C. On inocule tout le milieu d'ensemencement dans une cuve de fermentation de 10 litres en acier inoxydable contenant 7,5 litres du milieu de biotransformation décrit à l'exemple 1 et on stérilise à la vapeur à 120°C pendant 30 minutes, la solution de glucose étant stérilisée séparément et ajoutée à la concentration voulue dans la cuve de fermentation stérilisée. On laisse se développer la culture à 28°C tout en agitant à 230 tours/minute et on l'aère avec un débit d'air de 0,7 litre/litre du milieu/minute. Après 48 heures, on ajoute le composé constituant le substrat à la concentration indiquée à l'exemple 1 et l'on incube la culture pendant 3 jours supplémentaires pour obtenir une transformation de 60% du composé I en un composé II.

Exemple 3

On développe une culture de Mycobacterium fortuitum NRRL B 8119 pendant 5 jours à 30°C sur le milieu suivant : 0,8% de NaCl ; 0,8% de peptone ; 0,3% d'extrait de viande ; 0,3% de levure séchée ; 2% d'agar-agar ; eau distillée : pour compléter à 100 ml. On effectue la stérilisation à 110°C dans un autoclave pendant 20 minutes. On inocule la suspension de cellules ainsi obtenue dans le milieu de biotrans-

formation décrit à l'exemple 1 et on la laisse se développer pendant 3 jours à 30°C dans des ballons Erlenmeyer de 300 ml contenant 50 ml du milieu, en agitant à 220 tours/minute.

5 A ce moment, on ajoute le composé I formant le substrat à la concentration indiquée à l'exemple 1 et l'on incube la culture dans les mêmes conditions pendant 3 jours supplémentaires pour obtenir une transformation de 60% du composé I en un composé II.

10 Exemple 4

On développe une culture de Corynebacterium
mediolanum, ATCC 14004 pendant 5 jours à 30°C sur le milieu suivant : 0,8% de peptone ; 0,8% de NaCl ; 0,6% de levure séchée ; 2% d'agar-agar ; eau distillée : pour compléter à 100 ml. On effectue la stérilisation en autoclave à 110°C pendant 20 minutes. On inocule la suspension de cellules ainsi obtenue dans le milieu de biotransformation décrit à l'exemple 1 et on la laisse se développer pendant 3 jours à 30°C dans des ballons Erlenmeyer de 300 ml contenant 50 ml du milieu, en agitant à 220 tours/minute. A ce moment, on ajoute le composé I constituant le substrat à la concentration indiquée à l'exemple 1 et l'on incube la culture dans les mêmes conditions pendant 3 jours supplémentaires pour obtenir une transformation de 32% du composé I en un composé II.

25 Exemple 5

On filtre la bière complète (5 litres) provenant d'une fermentation suivant l'exemple 2 en utilisant 2% de terre d'infusoires comme adjuvant de filtration. On extrait le gâteau de filtre humide avec 3 litres de méthanol. Après filtration, on effectue deux extractions supplémentaires avec du méthanol pour assurer une récupération complète des pigments de couleur rouge-orange. On concentre les

35



extraits méthanoliques combinés sous pression réduite et on combine 1 litre du concentrat avec le bouillon filtré, puis on l'extrait complètement à un pH de 8,2 avec un mélange 9:1 de dichlorométhane et de méthanol.

- 5 On concentre l'extrait organique (contenant les composés I et II avec des quantités mineures de produits de dégradation) sous pression réduite jusqu'à siccité. On soumet le résidu en solution dans du dichlorométhane à une chromatographie dans une colonne de gel de silice
10 tamponnée à un pH de 7 avec un gradient d'un mélange de dichlorométhane, de méthanol et d'eau. On élue tout d'abord le composé I avec un mélange 89,5:10:0,5, puis on élue le composé FCE 22723 (II) avec un mélange 30:5,5:0,6.

- 15 A partir des fractions mises en commun, après lavage avec de l'eau, concentration à un faible volume en présence de n-propanol, addition d'un équivalent d'acide chlorhydrique et d'un excès d'éther diéthylique, on obtient le composé pur FCE 22723 (II, 0,72 g,
20 60%) sous forme de son chlorhydrate (point de fusion : 169-170°C, décomposition). En suivant le même procédé, on récupère également le composé I non transformé (0,48 g, 40%) sous forme de son chlorhydrate.

Exemple 6

- 25 On extrait la bière complète (500 ml) provenant d'une fermentation suivant l'exemple 3 et on soumet l'extrait obtenu à une chromatographie en colonne en adoptant le procédé décrit à l'exemple 5 ; on obtient le composé pur FCE 22723 (II, 0,07 g) et le composé I (0,05 g) sous forme de leurs chlorhydrates.
30

Exemple 7

- Comme décrit à l'exemple 5, on traite la bière complète (500 ml) provenant d'une fermentation suivant l'exemple 4 et l'on obtient le composé pur
35 FCE 22723 (II, 0,035 g) et le composé I (0,075 g)

8

005374

15

sous forme de leurs chlorhydrates.

g

REVENDICATIONS

1. Procédé de réduction microbienne stéréosélective du groupe fonctionnel 13-cétone de la 4-déméthoxydaunorubicine pour obtenir spécifiquement une
5 des deux 4-déméthoxy-13-dihydrodaunorubicines stéréoisomères possibles, ce procédé consistant à cultiver un nouveau mutant des espèces Streptomyces peucetius
subs. aureus (souche M 87 F.I.), Mycobacterium fortuitum ou Corynebacterium mediolanum en présence de
10 4-déméthoxydaunorubicine comme substrat, dans des conditions aérobies et dans un milieu de culture aqueux contenant une source assimilable de carbone et une source assimilable d'azote, puis récupérer, du milieu de culture, la 4-déméthoxy-13-dihydrodaunorubicine formée.
15

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'on effectue cette culture pendant 3 à 8 jours à une température de 25 à 37°C, de préférence, à une température de 29°C.

20 3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes complémentaires consistant à retirer le mycélium du milieu de culture par filtration à travers de la terre d'infusoires et récupérer, du mycélium ou des bouillons
25 filtrés, la 4-déméthoxy-13-dihydrodaunorubicine brute formée, par extraction avec un solvant approprié.

4. Procédé suivant la revendication 3, caractérisé en ce qu'on purifie la 4-déméthoxydaunorubicine brute obtenue par chromatographie sur du gel
30 de silice, pour l'isoler finalement sous forme de son chlorhydrate.

5. Procédé en vue de produire une nouvelle souche mutante du micro-organisme Streptomyces peucetius
subs. aureus, cette nouvelle souche étant appelée
35 M 87 F.I., ce procédé consistant à traiter le micro-

8

005374

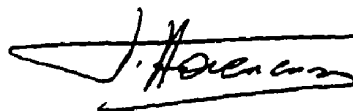
17

organisme Streptomyces peucetius subs. aureus avec de
la nitrosoguanidine.

Bruxelles, le 16 décembre 1982.

P.Pon. Société : FARMITALIA CARLO ERBA S.p.A.

Pr. OFFICE PARETTE (FRED . MAES).

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Haenen', is written over a horizontal line.