

Brevet N°	64068
du 5 avril 1982	
Titre délivré :	

## GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre  
de l'Économie et des Classes Moyennes  
Service de la Propriété Intellectuelle  
LUXEMBOURG

## Demande de Brevet d'Invention

## I. Requête

La société dite: BIOFARMA, 22, rue Garnier, à 92200 NEUILLY-SUR-SEINE, France, représentée par Monsieur Jacques de Muyser, agissant en qualité de mandataire (1)

dépose(nt) ce cinq avril 1982 quatre-vingt-deux (3)  
à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :  
1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant: "Nouvelle souche de fusarium utilisable pour la production (4)  
d'antibiotiques".

2. la délégation de pouvoir, datée de NEUILLY le 26 février 1982  
3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;  
4. 11 planches de dessin, en deux exemplaires;  
5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,  
le 5 avril 1982

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) : Jacques SERVIER, 92 rue Charles Lafitte, à 92200 NEUILLY-SUR-SEINE, France (5)

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de (6) brevet déposée(s) en (7) France  
le 7 avril 1981 (No. 81.06917) (8)

au nom de la déposante (9)  
établie pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg  
35, bld. Royal (10)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à 6 mois. (11)  
Le mandataire.

## II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

5 avril 1982

à 15 heures

Pr. le Ministre  
de l'Économie et des Classes Moyennes,

p.d.

A 68007

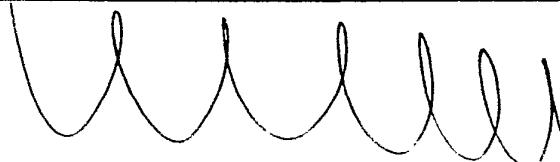
(1) Nom, prénom, firme, adresse — (2) si l'a lieu — (3) agissant en qualité de mandataire — (3) date du dépôt en toutes lettres — (4) titre de l'invention — (5) noms et adresses — (6) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité — (7) pays — (8) date — (9) déposant original — (10) adresse — (11) 6, 12 ou 18 mois.

# REVENDICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / ~~du modèle/ d'utilité~~

En FRANCE

Du 7 avril 1981



## Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

# BREVET D'INVENTION

au

## Luxembourg

au nom de : BIOFARMA

pour : "Nouvelle souche de fusarium utilisable pour la production d'antibiotiques".



La présente invention concerne un nouveau micro-organisme utilisable pour la production d'antibiotiques, et plus spécialement de la fusafungine, antibiotique d'usage externe pour le traitement des affections de la gorge.

- 5      La fusafungine et sa préparation à partir de *Fusarium lateritium* ont été décrites en particulier dans le brevet français N° 1.164.181 et ce micro-organisme a été déposé au Centraalbureau Voor Schimmelcultures à Baarn sous le N° CBS 119.63. Par ailleurs, le brevet français 1.392.717 décrit des perfectionnements apportés au procédé de préparation industrielle de la fusafungine, à partir de la même souche avec des rendements améliorés allant de 0,5 à 0,8g/l. D'autres procédés ont été essayés, mais n'ont pas permis d'améliorer le rendement, car la fusafungine, constituant du corps de *fusarium* est présente dans chaque souche à une concentration caractéristique.
- 15     D'autres souches ont été testées avec un rendement qui n'était pas plus avantageux et des conditions de culture plus difficiles.

L'invention vise à disposer d'une souche qui produise une quantité plus importante de fusafungine de qualité égale, et par le même procédé de préparation. La demanderesse a réussi à obtenir une nouvelle souche 20 sur ce critère.

Le but est atteint dans la mesure où les anciennes souches donnent, au stade du laboratoire, des rendements de l'ordre de 0,1 à 0,2g/l de fusafungine et la nouvelle souche donne de 0,6 à 0,9g/l, soit une rendement jusqu'à 6 fois supérieur. Au stade industriel, on a pu obtenir de 25 1,8 à 3,6 kg/m<sup>3</sup>, soit au moins trois à quatre fois plus que selon le brevet 1.392.717.

La nouvelle souche selon l'invention a été obtenue à partir de la souche CBS 119.63 par dissociation, isolement de

h

colonies, et ensemencement de différents supports.

A partir des spores prélevées sur différents supports susceptibles de contenir des agents mutagènes, des ensemencements sur milieu gélosé ont été réalisés. De ces cultures des dissociations 5 par dilutions successives sur milieux gélosés ont été effectuées pour obtenir des colonies isolées. Celles-ci ont été testées sur milieu de production. Rendement et composition de la fusafungine élaborée ont été déterminés.

La souche, objet de l'invention, a été retenue. Celle-ci est 10 maintenant stabilisée par lyophilisation sur lait écrémé.

D'après ses caractéristiques cette souche nouvelle appartient au genre fusarium. Elle a été déposée et identifiée au Centraalbureau Voor Schimmelcultures à Baarn sous le N° CBS 675.80.

La présente souche ne peut être identifiée à aucune des espèces 15 connues et il s'agit d'une nouvelle espèce que la demanderesse a appelée Fusarium lateritium Servier.

Etude morphologique:

La souche nouvelle: Fusarium Lateritium Servier CBS 675.80 est de couleur sombre, la sporulation est d'aspect sporodochium avec des 20 touffes de mycelium aérien - alors que la souche d'origine déposée au Centraalbureau Voor Schimmelcultures à Baarn sous le N° CBS 119.63 est claire, sa culture est lisse et la sporulation de type pionnote .

Etude Génétique:

La caractéristique biochimique de production importante de 25 fusafungine est transmise génétiquement. Elle caractérise donc un génome différent.

La transmission de ces caractères à travers trois générations successives en les comparant à deux autres souches connues, cultivées simultanément et repiquées sur 3 générations dans des conditions 30 identiques a été vérifiée par le protocole suivant:

*H*

On isole l'espèce sauvage CBS 119.63 conservée sur Cognassier Terreau ou Acacia Terreau de son milieu de conservation par passage sur milieu liquide de Scheffer, avant d'ensemencer un tube de gélose enrichi à la farine d'avoine, pour servir de référence.

5 L'espèce *Fusarium latéritium* Servier ayant ensemencé directement la gélose avoine, les protocoles suivis pour les trois espèces ont été identiques - isolement d'un élément - ensemencement - à la fin du cycle prélèvement de la majeure partie pour fermentation et analyse, - isolement d'un élément et réensemencement d'une nouvelle 10 gélose.

Le procédé est identique à la fin de la deuxième génération pour l'obtention d'une troisième génération.

Les procédures de fermentation ont été identiques pour les 3 générations des 3 souches et ont utilisé le même milieu.

15 Le tableau ci-après regroupe les résultats:

SOUCHE	PRODUCTION DE FUSAFUNGINE PAR LITRE DE MILIEU (en g)		
	1 ère génération	2ème génération	3ème. génér.
<i>F. latéritium</i> CBS 119.63 Cognassier-Terreau	0,1	0,12	0,09
" " CBS 119.63 Acacia-Terreau	0,14	0,17	0,13
" " Servier CBS 675.80	0,710	0,605	0,826

Etude Biochimique:

25 La quantité très forte de fusafungine présente, supérieure à toutes les concentrations connues dans d'autres souches, constitue une caractéristique biochimique de son originalité.

Il a été établi que la fusafungine produite par cette souche est identique à celle produite par les différentes autres espèces utilisées pour la production de fusafungine - tant par sa coloration son point de fusion que son pouvoir antibiotique et ses

spectres d'absorption des ondes électromagnétiques: infrarouge et ultraviolet. (Voir ci-dessous)

Préparation de la fusafungine:

La souche de *Fusarium latéritium* Servier peut être conservée  
5 sous forme lyophilisée dans des ampoules scellées.

Le contenu de l'Ampoule lyophilisée peut servir à ensemencer directement un tube de gélose enrichie tel qu'on en trouve dans le commerce ou selon les techniques classiques.

Le mycélium se développe progressivement, et il peut après un  
10 cycle total de 15 à 20 jours servir à réensemencer un autre tube pour obtenir la fermentation. On utilise un milieu composé de la façon suivante:

Saccharose 25g/l.  
Glucose massé 25g/l.  
15 Nitrate d'ammonium 10g/l.  
Phosphate monopotassique 5g/l.  
Sulfate de magnésium 2,5g/l.  
Le pH spontané est alors de 5,4 à 5,5.

Le milieu est alors stérilisé 30 minutes à 120°C et son pH passe  
20 alors à 4,8-5.

Le milieu est ensemencé puis on fixe sa température à 28°C.

On assure une aération de 1 litre d'air/min/l de milieu et on laisse fermenter pendant 95± 5 heures - jusqu'à épuisement des Hydrates de carbone..

25 Après fermentation le mycélium est extrait par un solvant chloré. Le solvant d'extraction est éliminé par évaporation sous pression réduite et le résidu est dissous dans un hydrocarbure duquel il est contre-extrait par un alcool aqueux.

La concentration de l'extrait hydroalcoolique provoque la  
30 précipitation du produit brut.

La purification est réalisée par traitement d'une solution alcoolique au noir activé spécialement traité pour cet usage. Le produit purifié est recristallisé dans un mélange composé d'alcool éthylique et d'eau.

Caractérisation :

5 P.F. = 128 - 131°C

Pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = 94$  à 104° (2%  $\text{CHCl}_3$ )

Spectre IR ( $\mu$ ) : 3,4 5,8 6,0 6,8 7,3 7,7  
8,0 8,5 9 9,2 10 11,6

L'invention comprend aussi une culture biologiquement pure de  
10 *Fusarium lateritium* Servier dont les caractéristiques correspondent à celles de la souche identifiée sous le N° CBS 675,80 et qui peut aussi produire la substance antibiotique par fermentation dans un milieu nutrifif.

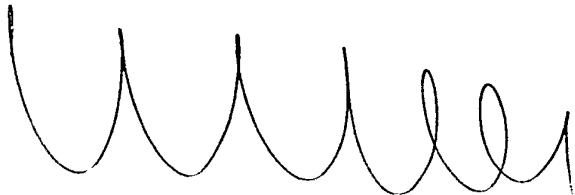
La souche objet de l'invention peut être utilisée pour la  
15 préparation de composés d'origine biologique notamment de la fusafungine qui peuvent être utilisés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire et constituer un médicament, un aliment, un adjuvant, etc...

On peut faire muter la souche employée selon cette invention par  
20 des agents de mutation artificielle connue : l'ultraviolet et les rayons X et diverses substances chimiques, telles que les nitroso-guanidines la mitomycine etc... et tous les mutants obtenus qui sont capables de produire la substance antibiotique fusafungine peuvent être utilisés dans l'exécution de la présente invention.



REVENDICATIONS

- 1) Nouvelle souche de *Fusarium Lateritium* dont les caractéristiques sont celles de la souche identifiée sous le N° CBS 675,80.
- 2) Utilisation de la souche selon la revendication 1 pour la production de composés d'origine biologique.
- 3) Utilisation de la souche selon la revendication 1 pour la production de fusafungine.

A handwritten mark consisting of a series of five distinct, downward-sweeping, curved lines of varying lengths, resembling a stylized signature or a mark.