

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

272 792

(11)

(13) B 2

(51) Int. Cl.⁵

C 07 H 15/24,
A 61 K 31/71

(21) PV 5113-88.C
(22) Přihlášeno 15 07 88

(40) Zveřejněno 13 06 90
(45) Vydáno 02 12 91

(72) Autor vynálezu

CASSINELLI GIUSEPPE, VOGHERA,
BORDONI TERESA, MILÁN,
MERLI SERGIO, BERNAREGGIO,
RIVOLA GIOVANNI, MILÁN (IT)

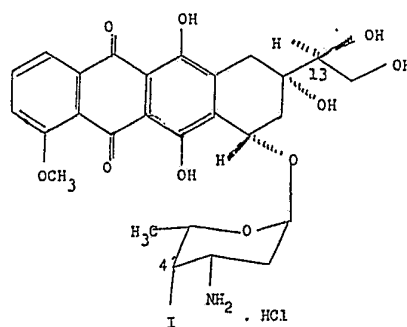
(73) Majitel patentu

FARMITALIA CARLO ERBA S.R.L., MILÁN (IT)

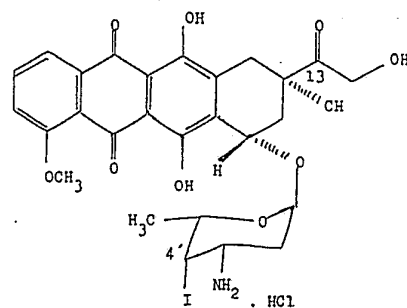
(54)

Způsob výroby 4'-deoxy-13(S)-dihydro-
-4'-jodrubicinu

(57) Řešení se týká mikrobiologického způsobu výroby 4'-deoxy-13(S)-dihydro-4'-jodrubicinu vzorce II tak, že se pěstuje za aerobních podmínek ve vodném živném prostředí obsahujícím využitelný zdroj uhlíku, dusíku a anorganické soli mutantu čeledi *Streptomyces* peucetius, kmen M 87 F.I. (DSM 2444) za přítomnosti 4'-deoxy-4'-joddoxorubicinu vzorce I, ve formě hydrochloridu a výsledný 4'-deoxy-13(S)-dihydro-4'-joddoxorubicin vzorce II se izoluje ve formě hydrochloridu. Produkt má protinádorový účinek.



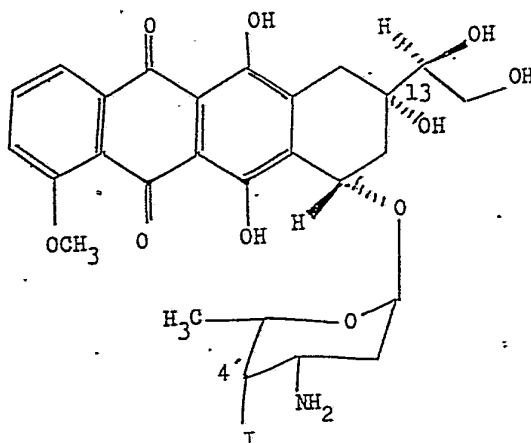
(II)



(I)

Vynález se týká mikrobiologického způsobu výroby 4'-deoxy-13(S)-dihydro-4'-jodrubicinu. Tato látka je účinným novým protinádorovým léčivem.

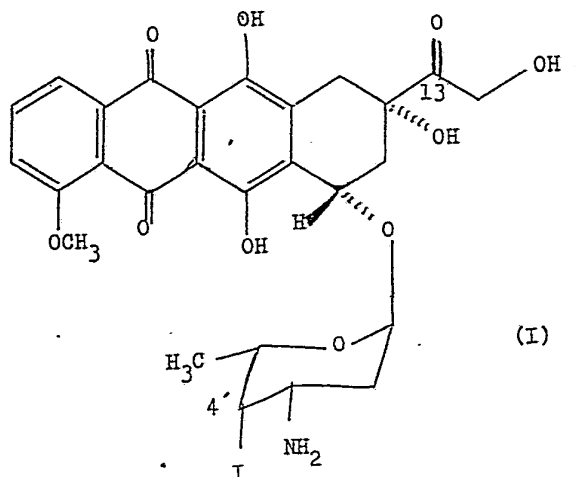
Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby 4'-deoxy-13(S)-dihydro-4'-joddoxorubicinu vzorce II



II

jakož i soli této sloučeniny, přijatelných z farmaceutického hlediska.

Postup se provádí tak, že se pěstuje za aerobních podmínek ve vodném živném prostředí, obsahujícím využitelný zdroj uhlíku, dusíku a anorganické soli mutantu čeledi *Streptomyces peucetius*, kmen M 87 F.I. (DSM 2444) za přítomnosti 4'-deoxy-4'-joddoxorubicinu vzorce I



čímž dojde ke stereoselektivní redukci ketonové skupiny v poloze 13 této látky, takže vzniká pouze jeden ze dvou možných stereoisomerů 4'-deoxy-13-dihydro-4'-joddoxorubicinu.

Nová sloučenina vzorce II, která byla označena FCE 24883 je použitelná jako protinádorová látka a má v případě pokusných nádorů účinek, který je srovnatelný s účinkem 4'-deoxy-4'-joddoxorubicinu vzorce I. Substrátem pro stereoselektivní redukci je semisyntetický analog doxorubicinu.

Způsob podle vynálezu je biosyntetický postup, ve kterém je mutanta čeledi *Streptomyces peucetius*, kmen M 87 F.I., který byl uložen ve sbírce Deutsche Sammlung von Mikroorganismen pod číslem DSM 2444 schopna stereoselektivně redukovat ketonovou funkční skupinu v poloze 13 výchozího 4'-deoxy-4'-joddoxorubicinu vzorce I. Sloučenina FCE 24883 vzorce II, která je výsledkem tohoto postupu, se hromadí v živném prostředí. Uvedenou látku je potom možno izolovat z fermentačního prostředí, koncentrovat ji a dále čistit.

4'-Deoxy-13(S)-dihydro-4'-joddoxorubicin vzorce II nebo jeho sůl, přijatelnou z farmaceutického hlediska je tedy možno získat tak, že se pěstuje *Streptomyces peucetius* kmen M 87 F.I. (DSM 2444) za přítomnosti 4'-deoxy-4'-joddoxorubicinu a potom se izoluje výsledný 4'-deoxy-13(S)-dihydro-4'-joddoxorubicin ve volné formě nebo ve formě své soli, přijatelné z farmaceutického hlediska.

Výhodná je zejména výsledná látka ve své čisté formě nebo její hydrochlorid.

Uvedenou sloučeninu je možno zpracovávat na farmaceutické prostředky, které obsahují sloučeninu vzorce II nebo její sůl, přijatelnou z farmaceutického hlediska jako účinnou složku ve směsi s ředidlem nebo nosičem, přijatelným z farmaceutického hlediska.

Mutace kmene *Streptomyces peucetius* subsp. *aureus* ATCC 31428 bylo dosaženo působením nitrosoguanidinu za vzniku laboratorního mikroorganismu, který byl označen *Streptomyces peucetius* kmen M 87 F.I. a který je schopen selektivně transformovat sloučeninu vzorce I na sloučeninu vzorce II. *S. peucetius* kmen M 87 F.I. byl uložen pod číslem DSM 2444 ve sbírce Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, NSR, a tvoří trvalou součást této sbírky.

Morfologie mutanty M 87 F.I. je nerozeznatelná od morfologie původního kmene *S. peucetius* ATCC 31428, avšak kultury v živném prostředí jsou jasně rozeznatelné podle svých růstových a biochemických vlastností. Mutanta M 87 F.I., nevytváří na agarových prostředcích slámově žlutý až citronově žlutý rozpustný pigment, který je charakteristickým znakem původního kmene *S. peucetius* ATCC 31428.

Mimoto je mutanta M 87 F.I. schopna selektivně transformovat sloučeninu vzorce I na sloučeninu vzorce II, kdežto původní kmen *S. peucetius* ATCC 31428 je v tomto smyslu neselektivní. Tato vlastnost uvedené mutanty činí mutantu vysoce použitelnou ve svrhu uvedeném smyslu.

Transformace

Stereoselektivní biologickou transformaci, která je podstatou způsobu podle vynálezu je možno uskutečnit v rostoucí kultuře *S. peucetius* M 87 F.I. tak, že se v průběhu inkubace přidá ke kultuře jako substrát sloučenina vzorce I.

Sloučeninu vzorce I je možno přidat ve formě hydrochloridu po jejím rozpuštění ve sterilní destilované vodě. Výhodné rozmezí koncentrace sloučeniny vzorce I v živném pro-

středí je 50 až 200 ug/l, způsob však nemá být na toto koncentrační rozmezí omezen. Uvedený mikroorganismus se pěstuje v živném prostředí, které obsahuje zdroj uhlíku, například využitelné uhlohydráty, zdroj dusíku, například využitelnou dusíkatou sloučeninu nebo bílkovinný materiál. Z využitelných výhodných zdrojů uhlíku je možno uvést glukózu, sacharózu, glycerol, škrob, kukuřičný škrob, dextrin, melasu a podobně. Výhodným zdrojem dusíku je například kukuřičný výluh, extrakt z kvasnic, sušené pivovarské kvasnice, sojová mouka, mouka z bavlíkových semen, kukuřičná mouka, kasein, rybí mouka, lihovarské výpalky, živočišný pepton, extrakt z masa, amonné soli a podobně. S výhodou je možno užít kombinaci zdrojů uhlíku a dusíku. Není nezbytně nutné přidat k fermentačnímu prostředí stopové prvky, například zinek, hořčík, mangan, kobalt, železo a podobně, protože voda z vodovodu a nečištěné složky obsahují jako složky živného prostředí uvedené stopové prvky.

Biologickou transformaci je možno provádět 72 hodin až 8 dní. Teplota v průběhu biologické transformace se může pohybovat v rozmezí 25 až 37 °C, s výhodou se postup provádí při teplotě 29 °C. Obsah transformačních nádob se provzdušňuje protřepáváním při frekvenci otáček 250 za minutu nebo mícháním při použití sterilizovaného vzduchu, čímž se podporuje růst použitého mikroorganismu, a tím se současně zvyšuje účinnost transformačního postupu.

Analytické metody

Postup mikrobiologické transformace je možno sledovat tak, že se odebírají v různých časových odstupech vzorky fermentačního prostředí a tyto vzorky se potom extrahují při pH 8,0 směsí dichlormethanu a methanolu v poměru 9 : 1. V případě, že se vzorek organického extraktu podrobí chromatografii na tenké vrstvě, přičemž jako eluční činidlo se užije směs chloroformu, methanolu, kyseliny octové a vody v objemovém poměru 80 : 20 : 7 : 3, má sloučeniny FCE 24883 vzorce II střední hodnoty R_f 0,50, kdežto 4'-deoxy-4'-jododoxorubicin vzorce I má R_f 0,60. Kvantitativní stanovení obou anthracyklinových derivátů je možno provést po chromatografii na tenké vrstvě při použití svrchu uvedeného elučního systému tak, že se odpovídající červeně zbarvené úseky vyjmou a vymyjí methanolem, potom se provádí spektrofotometrické stanovení při 496 nm.

Isolace

Výsledné živné prostředí, ve kterém byla sloučenina vzorce I přeměněna na sloučeninu vzorce II se zfiltruje při použití infusoriové hlínky. Červený myceliální koláč se extrahuje organickým rozpouštědlem, mísitelným s vodou, například methanolem nebo jiným nižším alkoholem, dioxanem, acetonitrilem, acetonem, s výhodou acetonem. Myceliální extrakty se spojí, odpaří se za sníženého tlaku a spojí se se zfiltrovaným fermentačním prostředím, upraví se na pH 8,0 a potom se extrahují organickým rozpouštědlem, nemísitelným s vodou, například n-butanolem, chloroformem, dichlormethanem, s výhodou směsí dichlormethanu a methanolu v objemovém poměru 9 : 1. Organické extrakty obsahují sloučeninu FCE 24883 vzorce II spolu se sloučeninou vzorce I a v menším některé degradační produkty.

Čištění

Organický extrakt se odpaří do sucha za sníženého tlaku, odparek se rozpustí v dichlormethanu a potom se chromatografie na sloupci silikagelu s pH 7 při použití stoupajícího gradientu dichlormethanu ve směsi methanolu a vody. Sloučenina I se vymývá nejprve při objemovém poměru uvedených látek 95 : 5 : 0,25 a potom se vymývá sloučenina FCE 24883 vzorce II. Ve směsi uvedených složek v objemovém poměru 90 : 10 : 0,5. Frakce s obsahem této látky se slíjí, promyjí se vodou, odpaří se na malý objem za přítomnosti n-propanolu, přidá se ekvivalentní množství kyseliny chlorovodíkové a přebytek n-hexanu, čímž se získá směs čistého hydrochloridu sloučeniny FCE 24883 vzorce II.

Chemické a fyzikální vlastnosti

Sloučenina FCE 24883 vzorce II ve volné formě je rozpustná v polárních organických rozpouštědlech a ve směsi vody a alkoholů, kdežto její hydrochlorid je rozpustný ve vodě a nižších alkoholech, avšak jen málo rozpustný v organických rozpouštědlech. Hydrochlorid sloučeniny FCE 24 883 má následující fyzikální a chemické vlastnosti:

Teplota tání : 200 °C za rozkladu

Specifická otáčivost $[\alpha]_D^{23} + 188^{\circ}$ (c 0,05, CH₃OH)

Absorpční spektrum v ultrafialovém světle: $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$

232, 254, 290 a 480 nm ($\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 492, 370, 127, 163$).

Infračervené spektrum v bromidu draselném má maxima při: 3 400, 2 970, 2 920, 1 610, 1 580, 1 472, 1 440, 1 410, 1 380, 1 355, 1 320, 1 280, 1 235, 1 210, 1 110, 1 080, 1 060, 1 030, 1 010, 985, 965, 940, 920, 900, 890, 870, 860, 830, 810, 785, 755, 730, 710, 540, 480, 450 a 415 cm⁻¹.

¹H-NMR spektrum (DMSO-d₆, 200 MHz, 22 °C):

14,03 (široký |dále b|s, 2H, OH-6, OH-11, 7,6 - 7,9 (m, 3H, H-1, H-2, H-3), 5,26 (m, 1H, H-1'), 4,96 (d, J = 5,2 Hz, 1H, OH-13), 4,92 (m, 1H, H-7), 4,55 (m, 1H, H-4'), 4,51 (t, J = 6,7 Hz, 1H, OH-14), 4,20 (s, 1H, OH-9), 3,97 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,76 (ddd, J = 3,5, 6,7, 11,0 Hz, 1H, CH(H)-OH), 3,60 (dq, J = 1,0, 6,0 Hz, H-5'), 3,48 ddd, J = 7,2, 6,7, 11,0 Hz, 1H, CH(H)-OH), 3,37 (ddd, J = 5,2, 3,5, 7,2 Hz, 1H, H-13), 3,02 (m, 1H, H-3'), 2,81 (m, 2H, CH₂-10), 2,15 (dd, J = 2,0, 15,3 Hz, 1H, H-8e), 1,97 (dd, J = 6,0, 15,3 Hz, 1H, H-8ax), 1,7 - 1,9 (m, 2H, CH₂-2'), a 1,14 δ (d, J = 6,0 Hz, 3H, CH₃-5').

Molekulový vzorec: C₂₇H₃₀N₁₀.HCl

hmotové spektrum v ekvivalentu k volné bazi: 656 (MH)⁺, 655 (M)⁺ a 416 (M)⁺, odpovídá aglykonu.

Při vysokotlaké kapalinové chromatografii je možno od sebe oddělit dva vrcholy s dobou retence 18,8 a 19,3 minut, tyto dva vrcholy odpovídají oběma stereoisomerním alkoholům, které jsou přítomny ve vzorku syntetického 4'-deoxy-13-dihydro-4'-joddoxorubicinu, který byl připraven redukcí sloučeniny vzorce I působením borohydridu sodíku.

Při použití vysokotlaké kapalinové chromatografie se sloučenina FCE 24883 vzorce II jeví jako jediný vrchol s dobou retence 19,3 minuty, odpovídající pomaleji se pohybující

složce syntetického 13-dihydroderivátu.

Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Sloupce: dva sloupce inatoměničové pryskyřice RP Spherisorb S30DS2 (C18, 3 μ m, Phase Separation U.K) 150 x 4,5 mm, sloupce byly za sebou zařazeny v sérii.

Teplota: 45 $^{\circ}$ C

Mobilní fáze A: 0,05 M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného, upravený na pH 3,0 přidáním směsi 1M kyseliny fosforečné a methanolu v objemovém poměru 80 : 20.

Mobilní fáze B: methanol

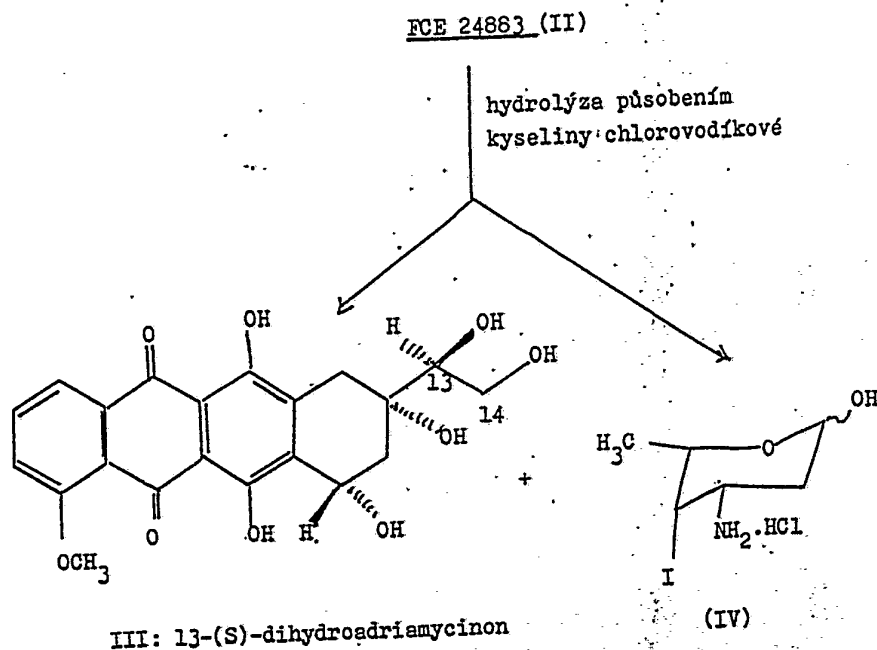
Eluce: isokraticky po dobu 30 minut (42 %A + 58 %B)

Rychlost průtoku: 0,6 ml/min.

Detekce: při 254 nm.

Osvětlení struktury

Při hydrolýze sloučeniny vzorce II v kyselém prostředí, trvající 30 minut při teplotě 80 $^{\circ}$ C v 0,2 N vodném roztoku kyseliny chlorovodíkové se získá červená sraženina odpovídajícího aglykonu vzorce III, kdežto cukerná složka, a to 3-amino-2,3,4,6-tetra-deoxy-4-jod-L-lyxohexohexosa, vzorce IV, přítomná ve vodné fázi byla identifikována srovnáním s autentickým vzorkem, který byl získán hydrolýzou sloučeniny vzorce I v kyselém prostředí.



Absolutní konfigurace (S)- v poloze 13 sloučeniny III byla stanovena přímým srovnáním¹ H-NMR spektra, hmotového spektra a chromatografie na tenké vrstvě 9,13-O-isopropyliden-

-14-0-terc.butyldifenylsilylového derivátu s odpovídajícím autentickým vzorkem 13-(S)-dihydroadriamycinonu, který byl získán způsobem podle publikace S. Penco a další, *Gazzetta Chimica Italiana*, 115, 195 (1985).

Biologická účinnost

Cytotoxická účinnost sloučeniny FCE 24883 vzorce II byla zkoumána in vitro na tvorbě kolonií HeLa buněk a buněk P 388 ve srovnání s účinností sloučeniny vzorce I a doxorubicin. Jak je dále zřejmé z údajů, uvedených v tabulce I, jeví se sloučenina vzorce II stejně účinná jako 4'-deoxy-4'-joddoxorubicin vzorce I a doxorubicin.

Protinádorová účinnost sloučeniny FCE 24883 vzorce II in vivo byla zkoumána proti roztroušené Grossově leukemii. Myši kmene C3H byly infikovány nitrožilně množstvím 2.10^6 buněk/myš a potom léčeny uvedenými látkami 24 hodin po infekci nádorem.

V tabulce II jsou uvedeny výsledky dvou pokusů. V optimální dávce byla sloučenina FCE 24883 vzorce II účinnější, než doxorubicin a stejně účinná jako 4'-deoxy-4'-joddoxorubicin vzorce I při menší toxicitě v účinných dávkách. Protinádorovou účinnost sloučeniny vzorce II, vyhodnocenou jako střední doba přežití ošetřených zvířat proti kontrole je možno srovnat s účinností sloučeniny vzorce I a doxorubicinu.

Tabulka I

Účinnost in vitro 13-(S)-dihydro-4'-joddoxorubicinu FCE24883 vzorce II ve srovnání s účinností 4'-deoxy-4'-joddoxorubicinu FCE 21954 vzorce I a doxorubicinu (Dx)

sloučenina	ID ₅₀ ng/ml ^{a)}	
	HeLa ^{b)}	P388 ^{c)}
Dx	10,8	8
FCE 21954 (I)	10,4	2,1
FCE 24883 (II)	8	3,5

a) dávka zajišťující 50% snížení počtu buněk ve srovnání s kontrolou

b) buňky epitheloidního karcinomu lidského děložního krčku

c) leukemické buňky P388

Tabulka II

Účinnost 13-(S)-dihydro-4'-joddoxorubicinu FCE24883 vzorce II ve srovnání s účinností 4'-deoxy-4'-joddoxorubicinu FCE 21954 vzorce I a doxorubicinu (Dx) proti diseminované Rossově leukemii

Sloučenina:	dávka a) (mg/kg)	T/C% b)	úmrtí pro toxicitu c)
Dx	10	200 (200, 200)	0/20
	13	225 (230, 220)	0/20
	16,9	250 (260, 240)	2/20
FCE 21954 (I)	4	240 (240, 240)	0/20
	5,2	260 (260, 260)	4/20
	6,8	145 (160, 130)	19/20
FCE 24883 (II)	4	180 (180)	0/10
	5,2	220 (220, 220)	0/20
	6,8	220 (220, 220)	0/20
	8,8	140 (140)	5/9

- a) myším C3H bylo podáno nitrožilně $2 \cdot 10^6$ leukemických buněk a potom byly myši léčeny nitrožilně den po infekci nádorem
- b) je uvedena střední doba přežití ošetřených myší/střední doba přežití kontrol $\times 100$
- c) vyhodnoceno na základě pitevního nálezu na myších

Praktické provedení způsobu podle vynálezu bude osvětleno v následujících příkladech.

P ř í k l a d 1

Kultura *Streptomyces peucetius* kmen M 87 F.I. DSM 2444 se pěstuje 14 dnů při teplotě 28°C na šikmém agaru na následujícím udržovacím živném prostředí (prostředí SA): glukosa 3 %, sušené pivovarské kvasnice 1,2 %, chlorid sodný 0,1 %, dihydrogenfosforečnan draselný 0,05 %, uhličitán vápenatý 0,1 %, síran hořečnatý 0,005 %, síran železnatý . $7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005 %, síran zinečnatý . $7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005 %, síran měďnatý . $5\text{H}_2\text{O}$. 0,005 %, agar 2% voda z vodovodu do 100 ml, pH 6,7 . Sterilizace se provádí zahříváním v autoklávu 20 minut na teplotu 115°C .

Spory takto pěstované kultury se izolují a uvedou do suspenze ve 3 ml sterilní destilované vody. Suspenze se potom užije k naočkování Erlenmayerových baněk o objemu 300 ml s obsahem 60 ml následujícího kapalného živného prostředí: sušené pivovarské kvasnice 0,3 %, pepton 0,5 %, dusičnan vápenatý . $4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, voda z vodovodu do 100 ml. Sterilizace se provádí zahříváním v autoklávu 20 minut na teplotu 120°C . Po sterilizaci je pH tohoto prostředí v rozmezí 6,8 až 7,0. Naočkované baňky se protřepávají 2 dny při teplotě 28°C na rotační třepačce při frekvenci otáček 250/min. Výkyv třepačky má průměr 7 cm. Potom se užije 1,5 ml takto vypěstované kultury k naočkování Erlenmayerových baněk o objemu 300 ml s obsahem 50 ml následujícího biotransformačního živného prostředí: extrakt z kvasnic 1,5%, dihydrogenfosforečnan draselný 0,25 %, glukóza 1,5 %, voda z vodovodu do 100 ml. Prostředí má pH 6,9. Toto prostředí se potom sterilizuje zahříváním v autoklávu 20 minut na teplotu 115°C . Roztok glukózy se sterilizuje odděleně a přidá se ke každé sterilizované baňce do příslušné koncentrace.

Potom se baňky inkubují stejně jako svrchu 24 hodin při teplotě 28 °C. Potom se do každé baňky přidá 1,0 ml roztoku sloučeniny I ve sterilní destilované vodě do koncentrace 5 mg/ml. Potom se baňky inkubují ještě 2 dny za protřepávání, čímž se dosáhne 70% přeměny sloučeniny I na sloučeninu vzorce II.

P ř í k l a d 2

Kultura *S. peucetius* kmen M 87 F.I. se pěstuje na pevném živném prostředí stejně jako v příkladu 1. Spory ze tří kultur na šikmém agaru se izolují a shromáždí do 10 ml sterilní destilované vody a takto získaná suspenze se užije k naočkování baňky s okouhlým dnem o objemu 2 litry s obsahem 500 ml růstového prostředí z příkladu 1. Baňka se inkubuje 48 hodin na rotační třepačce při 120 otáčkách za minutu při výkyvu 7 cm v průměru a při teplotě 28 °C. Celý obsah baňky se užije k naočkování fermentoru z nerezové oceli o objemu 10 litrů s obsahem 7,5 litrů biotransformačního prostředí z příkladu 1, prostředí se sterilizuje parou 30 minut při teplotě 120 °C, roztok glukózy se sterilizuje odděleně a přidá se v příslušné koncentraci ke sterilizovanému fermentoru. Potom se kultura nechá růst za míchání při teplotě 28 °C při frekvenci otáček 230 za minutu a provzdušňuje se procházejícím vzduchem v množství 0,7 litrů na litr živného prostředí za minutu.

Po 48 hodinách se přidá substrát stejně jako v příkladu 1 a kultura se inkubuje ještě 3 dny za dosažení 60% přeměny sloučeniny I na sloučeninu II.

P ř í k l a d 3

5 litrů fermentačního prostředí, získaného v příkladu 2 se zfiltruje při použití 2% infusoriové hlínky jako pomocného prostředku pro filtraci. Vlhký filtrační koláč se extrahuje 3 litry acetonu. Po filtraci se provedou ještě dvě extrakce acetonu, aby bylo dosaženo úplné extrakce červených pigmentů. Acetonové extrakty se slíjí, odpaří za sníženého tlaku a 1 litr koncentráту se smísí se zfiltrovaným živným prostředím a směs se důkladně extrahuje při pH 8 směsí dichlormethanu a methanolu v poměru 9 : 1. Organický extrakt, obsahující sloučeninu I a II a některé degradační produkty se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí v dichlormethanu a chromatografuje na sloupci silikagelu v M/15 fosfátovém pufru o pH 7 při použití gradientu směsi dichlormethanu, methanolu a vody. Některé degradační produkty odcházejí jako první, potom se vymyje sloučenina I směsí uvedených látek v objemovém poměru 95 : 5 : 0,25 a potom sloučenina FCE 24883 vzorce II směsí uvedených látek v poměru 90 : 10 : 0,5.

Ze spojených frakcí se po promytí vodou, zahuštění na malý objem za přítomnosti n-propanolu a přidání ekvivalentu kyseliny chlorovodíkové a přebytku n-hexanu získá ve výtěžku 60 % celkem 0,30 g čisté sloučeniny FCE 24883 vzorce II jako hydrochlorid s teplotou tání 200 °C za rozkladu. Stejným způsobem se získá také ve výtěžku 26 % celkem 0,13 g nepřeměněné sloučeniny I ve formě hydrochloridu.

P ř í k l a d 4

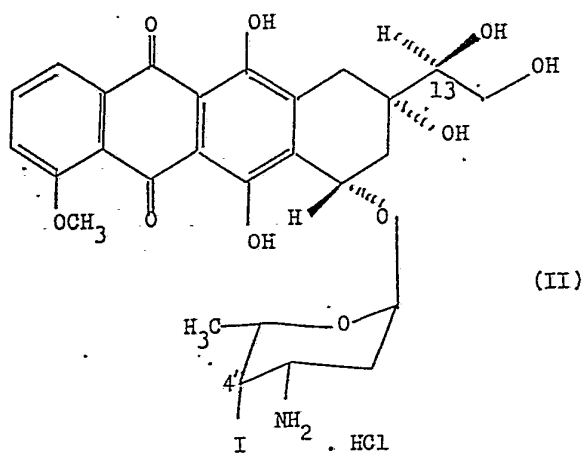
Vzorek 200 mg sloučeniny FCE 24883 vzorce II se rozpustí v 50 ml 0,2 N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a roztok se zahřívá 30 minut na 100 °C. Filtrací se potom

oddělí 0,12 g krystalické červené sraženiny aglykonu vzorce III, který se promyje vodou a usuší.

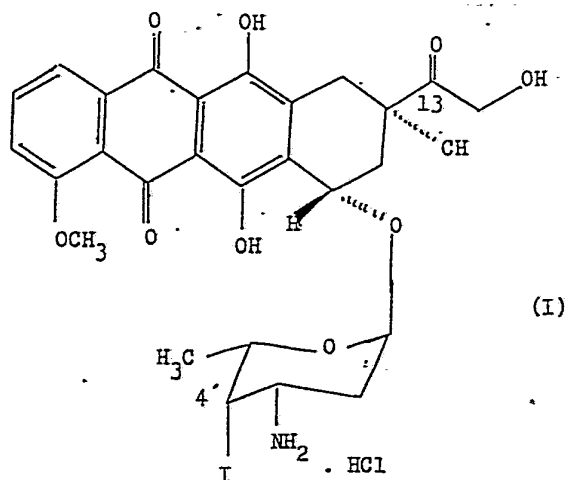
Hmotové spektrum: m/e 416 (M^+). Aglykon vzorce III byl identifikován jako 13-(S)-dihydroadriamycinon srovnáním s autentickým vzorkem.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby 4'-deoxy-13-(S)-dihydro-4'-jodrubicinu vzorce II



mikrobiologickým postupem, vyznačující se tím, že se pěstuje za aerobních podmínek ve vodném živném prostředí, obsahujícím využitelný zdroj uhlíku, dusíku a anorganické soli mutanta čeledi *Streptomyces peucetius*, kmen M 87 F.I. (DSM 2444) za přítomnosti 4'-deoxy-4'-joddoxorubicinu vzorce I



ve formě hydrochloridu a výsledný 4'-deoxy-13-(S)-dihydro-4'-joddoxorubicin vzorce II se izoluje ve formě hydrochloridu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se kultivace provádí při teplotě 25 až 37 °C, s výhodou při teplotě 29 °C po dobu 72 hodin až 8 dnů.
3. Způsob podle bodů 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se antracyklinový glykosid vzorce II podle bodu 1 extrahuje z myceliálního koláče acetonem a ze zfiltrovaného fermentačního prostředí směsí dichlormethanu a methanolu v objemovém poměru 9 : 1 při pH 8, extrakty se spojí a odpaří se do sucha za sníženého tlaku.
4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že se získaný surový produkt rozpustí v dichlormethanu a roztok se chromatograficky čistí na sloupci silikagelu, pufovaném na pH 7, přičemž sloupec se vymývá nejprve směsí dichlormethanu, methanolu a vody v objemovém poměru 95 : 5 : 0,25 k odstranění nezreagované výchozí látky vzorce I a potom směsí dichlormethanu, methanolu a vody v objemovém poměru 90 : 10 : 0,5, získané frakce se odpaří za přítomnosti n-propanolu a požadovaný 4'-deoxy-13-(S)-dihydro-4'-joddoxorubicin vzorce II se izoluje ve formě hydrochloridu v čisté formě přidáním ekvivalentního množství kyseliny chlorovodíkové a přebytku n-hexanu.