

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 585 366

(21) N° d'enregistrement national :

85 11221

(51) Int Cl⁴ : C 12 P 17/12 // A 61 K 31/49; C 07 D 453/04;
(C 12 P 17/12, C 12 R 1:59) (C 12 R 1/67, 1:685, 1:845)
(C 12 R 1/785, 1:80).

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(24) Date de dépôt : 23 juillet 1985.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 5 du 30 janvier 1987.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(71) Demandeur(s) : *ETABLISSEMENTS NATIVELLE Société
Anonyme. — FR.*

(72) Inventeur(s) : François-Xavier Jarreau, Robert Azerad et
Thierry Ogerau.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Office Picard.

(54) Procédé d'hydroxylation par voie microbiologique de la quinine, de la quinidine, et de dérivés.

(57) L'invention concerne la préparation de dérivés hydroxylés
de la quinine et de la quinidine.

Le procédé consiste à faire agir un microorganisme du type
champignon inférieur choisi dans le groupe constitué par *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Cunninghamella echinulata*, *Curvularia lunata*, *Mucor circinelloides*,
Mucor plumbeus, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus arrhizus*
ou du type bactérien tel que *Streptomyces rimosus*, sur le
composé à hydroxyler dans des conditions de fermentation
aérobie, en culture immergée.

Application à l'hydroxylation régiospécifique et stéréospé-
cifique de la quinidine.

FR 2 585 366 - A1

D

L'invention concerne un procédé d'hydroxylation d'alcaloïdes du quinquina, et plus particulièrement un nouveau procédé d'hydroxylation de la quinine, de la quinidine, et de dérivés, par voie microbiologique.

5 L'hydroxylation microsomale hépatique constitue souvent l'une des premières étapes du métabolisme d'un composé chimique étranger introduit dans l'alimentation ou la circulation sanguine des mammifères. Ces hydroxylation, suivies d'autres réactions, comme la O-méthylation ou la conjugaison,
10 gaison, sont destinées à rendre ces substances plus hydrosolubles, donc à accélérer leur élimination. Cependant dans certains cas, les dérivés hydroxylés se trouvent être plus actifs, ou plus toxiques, que la molécule originale, ce qui justifie l'intérêt de leur identification, et par suite de
15 leur préparation pour l'étude de leur activité.

Les méthodes de synthèse organique présentent des facilités évidentes pour les métabolites de substances simples, mais la préparation chimique de métabolites de molécules plus complexes (et optiquement actives) peut nécessiter une
20 quantité d'efforts et de temps considérable.

Les hydroxylation par voie microbiologique ont déjà été considérablement développées depuis de nombreuses années, dans le domaine des stéroïdes, où elles ont permis l'obtention, à l'échelle industrielle, de produits hydroxylés régio- et stéréosélectivement, résultant de l'oxydation spécifique d'atomes de carbone non fonctionnalisés. De
25 telles molécules auraient demandé des efforts synthétiques considérables si des méthodes purement chimiques avaient dû être employées. Cette méthode a depuis été appliquée à d'autres familles de molécules et constitue, dans certains
30 cas, un mode privilégié d'obtention de composés nouveaux, transposable à grande échelle, en utilisant les techniques et les équipements classiques des fermentations. De plus, il

apparaît que les hydroxylations microbiennes conduisent pour chaque espèce à un éventail de métabolites souvent beaucoup plus restreint que celui des systèmes de mammifères, ce qui élimine certains problèmes de séparation; il suffit alors de
5 jouer sur la multiplicité des souches pour reconstituer la variété éventuelle des métabolites hépatiques.

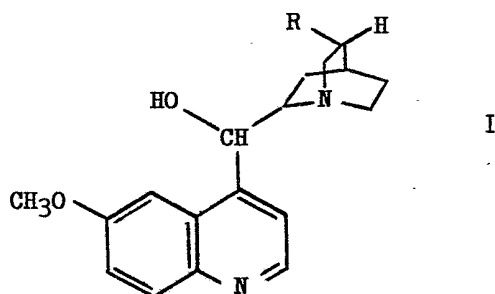
Toutefois, dans le domaine des alcaloïdes, assez peu de réactions de ce type ont été décrites, et elles portent pour la plupart sur la partie non azotée de la molécule, aromatique ou stéroïdique. Il est pourtant souhaitable et intéressant de pouvoir effectuer dans de bonnes conditions
10 l'hydroxylation de noyaux azotés d'alcaloïdes dont les produits ont déjà été reconnus comme des métabolites actifs. En particulier, le brevet français 2.506.312 décrit des dérivés
15 hydroxylés de la quinidine, tels que l'hydroxy-3 dihydro-10,11 quinidine et ses épimères 3R et 3S, utilisables en thérapeutique pour le traitement des arythmies cardiaques. On sait par ailleurs que la quinine, dont les propriétés pharmacologiques sont connues, et la quinidine sont deux
20 isomères se différenciant par leurs configurations au niveau des atomes de carbone en positions 8 et 9.

La préparation de ces composés actifs, optiquement purs, par une méthode microbiologique transposable à l'échelle industrielle représente donc un objectif d'un
25 intérêt évident, par rapport aux hydroxylations de type chimique qui conduisent, avec un rendement médiocre, à un mélange diastéréoisomérique.

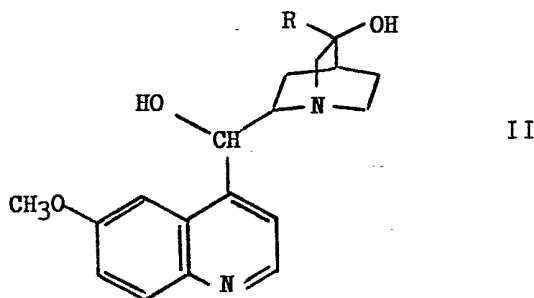
La présente invention a donc pour objet un nouveau procédé d'hydroxylation microbiologique de la quinine, la
30 quinidine, et leurs dérivés, en particulier leurs dérivés hydrogénés, de manière régio- et stéropécifique, pour obtenir des composés optiquement purs.

L'invention a également pour objet un procédé d'hydroxylation microbologique de la quinine, la quinidine, et leurs dérivés, susceptible d'être mis en oeuvre industriellement et de procurer des composés optiquement purs avec un rendement satisfaisant au moyen d'un appareillage de type conventionnel.

Le procédé d'hydroxylation microbologique régiospécifique et stéréospécifique suivant l'invention, permet d'hydroxyler en position 3S la quinine, la quinidine et leurs dérivés représentés par la formule (I) :



dans laquelle R représente un groupe éthyle ou un groupe vinyle pour former les dérivés 3S-hydroxylés correspondants, de formule (II) :



dans laquelle R a la même signification que ci-dessus, en faisant agir sur les composés de formule (I) un microorganisme du type champignon inférieur choisi dans le groupe constitué par *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*,

Aspergillus niger, *Cunninghamella echinulata*, *Curvularia lunata*, *Mucor circinelloides*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus arrhizus* ou du type bactérien tel que *Streptomyces rimosus*.

- 5 Dans la formule (I) ci-dessus, R représente un groupe
vinyle dans le cas de la quinine et de la quinidine, qui se
différencient par leurs configurations au niveau des atomes
de carbone en positions 8 et 9, et R représente un groupe
éthyle dans le cas des dérivés hydrogénés, c'est-à-dire la
10 dihydroquinine et la dihydroquinidine. La même observation
vaut pour les dérivés hydroxylés de formule (II).

- On utilise de préférence les souches identifiées
ci-après : *Aspergillus ochraceus* (ATCC 1008), *Aspergillus*
flavus (MMP 3249), *Aspergillus niger* (NRRL 599), *Cunningha-*
15 *mella echinulata* (NRRL 3655, MMP 2203), *Curvularia lunata*
(NRRL 2380), *Mucor circinelloides* (CBS 108-16), *Mucor*
plumbeus (MMP 430, CBS 111-07), *Rhizopus arrhizus* (ATCC
11145), *Streptomyces rimosus* (NRRL 2234), et *Penicillium*
purpurogenum (MMP 222 bis), et le procédé consiste à faire
20 agir l'un des microorganismes ci-dessus sur le composé à
hydroxyler.

- Les références ci-dessus ont les significations con-
nues, c'est-à-dire, NRRL : Agricultural Research Culture
Collection, Northern Regional Research Center, Peoria, Ill.
25 (USA); ATCC : American Type Culture Collection, Rockville,
Md. (USA); CBS : Centraal Bureau voor schimmelcultures, Baarn
(Pays-Bas); MMP : Mycothèque du Museum d'Histoire Naturelle,
Paris (France).

- Suivant le procédé d'hydroxylation de l'invention, il
30 est préférable de faire croître le microorganisme dans un
milieu de culture contenant des sources assimilables de car-
bone, d'azote et de sels minéraux, dans des conditions de

fermentation aérobie, en culture immergée. Le composé à hydroxyler est ajouté, de préférence stérilement, au milieu, on laisse incuber jusqu'à obtenir une quantité suffisante de produit hydroxylé, et on extrait par les techniques
5 usuelles. L'incubation peut s'effectuer dans un fermenteur de type usuel, à une température comprise entre 20 et 30°C environ, le pH du milieu étant voisin de 7. On peut le cas échéant utiliser un milieu dont le pH est compris entre 6 et 8 environ, sans modifier sensiblement les résultats.

10 Le procédé utilisé consiste à faire pousser les micro-organismes dans le milieu de culture adéquat afin d'obtenir une biomasse bien développée; ce milieu peut contenir à côté d'une source de carbone assimilable (glucose, saccharose, amidon, mannitol, purs ou en mélange avec d'autres carbohy-
15 drates) à une concentration de 1 à 10%, une source d'azote organique (peptones, asparagine, hydrolysats protéiques) ou minéral (sels d'ammonium, nitrates), et les sels minéraux nécessaires ainsi que des substances vitaminiques (telles que celles présentes dans le "corn steep", l'extrait de
20 levure,...); la température peut varier de 20 à 30°C environ selon les souches, et la culture est effectuée en milieu agité. Lorsque la croissance est jugée satisfaisante et en général lorsque le carbohydrate substrat est épuisé, c'est-à-dire au bout de 2 à 5 jours environ, on ajoute stéri-
25 lement le composé à hydroxyler, solide ou en solution dans un petit volume de solvant organique miscible à l'eau (par exemple l'éthanol), à une concentration finale pouvant aller de 0,2 à plusieurs g./litre suivant la molécule ou la souche. L'incubation, qui peut s'accompagner d'une faible
30 croissance résiduelle, est poursuivie, en agitant vigoureu- sement pour aérer le mélange, aux mêmes températures, pendant un temps de 2 à 40 jours.

Suivant une variante du procédé de l'invention, l'incubation du composé à hydroxyler est faite avec des cellules

préalablement lavées et remises en suspension dans un milieu aqueux tamponné ne contenant pas de source de carbone ou d'azote. L'hydroxylation est alors effectuée après avoir fait croître le microorganisme et après avoir récolté le mycélium, en absence de croissance.

L'extraction des produits de l'incubation ainsi que celle du substrat résiduel est effectuée à l'aide d'un solvant organique non miscible à l'eau (chlorure de méthylène, chloroforme, acétate d'éthyle, etc) après avoir éliminé le mycélium par filtration et saturé le filtrat en sels (NaCl , Na_2SO_4).

La détection et l'identification des produits d'hydroxylation peut être effectuée par chromatographie sur couche mince de gel de silice ou par chromatographie liquide haute pression sur phase inverse. La séparation du produit hydroxylé du substrat de départ éventuellement restant et sa purification sont effectuées par les techniques classiques de cristallisation ou de chromatographie sur adsorbants minéraux.

Les produits d'hydroxylation purifiés ont été identifiés par comparaison aux produits (3S)-hydroxy authentiques (préparés par voie chimique ou décrits dans la littérature) dans divers systèmes chromatographiques, ainsi que par les techniques spectroscopiques (UV, ^1H - ou ^{13}C -RMN) et polarimétriques usuelles.

Les résultats obtenus sont rapportés dans les exemples suivants où plusieurs souches de microorganismes capables de réaliser ces hydroxylations d'une manière régio- et stéréosélective, à partir de plusieurs des substrats envisagés, avec un taux de conversion variable, ont été caractérisées. Outre cet avantage essentiel de la sélectivité de l'hydroxylation, un autre avantage est l'absence de formation

d'autres métabolites en quantités significatives, ce qui simplifie la purification et permet le recyclage du substrat éventuellement non métabolisé.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

EXEMPLE 1

Hydroxylation de la quinidine par *M.plumbeus*

A 100ml de milieu A décrit ci-après, ajusté à pH7, dans un erlenmeyer de 250ml, sont ajoutés quelques gouttes d'une suspension de spores de *M.plumbeus* MMP 430. On incube 72 heures à 27°C dans un agitateur rotatif (327 trs/mn). On ajoute alors stérilement à la culture une solution de 50mg de quinidine dans 1ml d'éthanol et on continue à agiter 14 jours dans les mêmes conditions. La culture est filtrée sur célite, le filtrat saturé par NaCl amené à pH 10-12 par NaOH 2N puis extrait 6 fois au chlorure de méthylène. Les fractions organiques séchées puis évaporées sont chromatographiées sur couche préparative de gel de silice en utilisant le solvant $\text{CHCl}_2\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}$ (85:14:1). La bande de (3S)-3-hydroxy quinidine, repérée par sa fluorescence à 254nm et sa migration inférieure à celle de la quinidine, est grattée et éluée par le méthanol. On obtient 1mg de (3S)-3-hydroxy quinidine identique sous tous rapports à un échantillon authentique. La quinidine non réagie est récupérée de la même manière presque quantitativement (42mg).

Milieu A :

	corn steep	10 g
	$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
	KCl	0,5 g
30	NaNO_3	2 g
	$\text{FeSO}_4, 7,2\text{O}$	0,02g
	D-glucose	30 g

KH_2PO_4 1 g
 K_2HPO_4 2 g
eau distillée, pour compléter à 1 litre.

EXEMPLE 2

5 Hydroxylation de la dihydroquinidine par *M.plumbeus*

La même incubation, effectuée sur une culture analogue de *M.plumbeus* CBS 111-07 avec 1g/litre en concentration finale de dihydroquinidine, fournit après 20 jours 6mg de (3S)-3-hydroxy dihydroquinidine identique à un échantillon
10 authentique et 80mg de dihydroquinidine récupérée.

EXEMPLE 3

Hydroxylation de la dihydroquinidine par *S.rimosus*

A 100ml de milieu B décrit ci-après, ajusté à pH7, dans un erlenmeyer de 250ml, sont ajoutés quelques ml d'une pré-
15 culture de *S.rimosus* NRRL 2234. On cultive 72 heures à 27°C; on ajoute 100mg de dihydroquinidine en solution dans 1ml d'éthanol et on continue à agiter pendant 25 jours dans les mêmes conditions. On obtient de la même manière 4mg de (3S)-3-hydroxy dihydroquinidine et 85mg de dihydroquinidine
20 récupérée.

Milieu B :

Bacto Casamino acids Difco 5 g
extrait de levure 3 g
D-glucose 30 g
25 eau distillée, pour compléter à 1 litre.

EXEMPLE 4

Hydroxylation de la quinine par *C.echinulata*

La même incubation, effectuée sur une culture analogue (milieu A) de *C.echinulata* NRRL 3655, avec 1g/litre en con-

centration finale de quinine, fournit après 30 jours 9,5mg de (3S)-3-hydroxy quinine identique à un échantillon authentique et 75mg de quinine récupérée. On constate également la formation de deux autres produits (fluorescents à 254nm) en
5 faible quantité.

EXEMPLE 5

Hydroxylation de la dihydroquinine par *M.circinelloides*

La même incubation, effectuée sur une culture analogue (milieu A) de *M.circinelloides* CBS 108-16, avec 1g/litre en
10 concentration finale de dihydroquinine, fournit après 36 jours 17mg de (3S)-3-hydroxy dihydroquinine identique à un échantillon authentique et 70mg de dihydroquinine récupérée.

EXEMPLE 6

Hydroxylation de la dihydroquinidine par *M.plumbeus*

15 Deux cultures de 100ml de *M.plumbeus* MMP430 sur le même milieu A que dans l'exemple 1, sont réunies, centrifugées, et le mycélium, lavé stérilement avec un tampon phosphate contenant 2g de K_2HPO_4 et 1g de KH_2PO_4 par litre d'eau distillée, est repris dans 100ml du même tampon et incubé avec
20 0,5g/litre en concentration finale de dihydroquinidine.

Après 5 jours d'agitation à 27°C, on obtient 6,5mg de (3S)-3-hydroxy dihydroquinidine, et 40mg de dihydroquinidine récupérée, par les techniques usuelles.

R E V E N D I C A T I O N S

1. Procédé d'hydroxylation microbiologique régiospécifique et stéréospécifique, en position 3S, de la quinine, la quinidine et leur dérivés, caractérisé en ce qu'on fait agir un microorganisme du type champignon inférieur choisi dans le groupe constitué par *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Cunninghamella echinulata*, *Curvularia lunata*, *Mucor circinelloides*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus arrhizus* ou du type bactérien tel que *Streptomyces rimosus*, sur le composé à hydroxyler.
2. Procédé d'hydroxylation selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on fait croître le microorganisme dans un milieu de culture contenant des sources assimilables de carbone, d'azote et de sels minéraux, dans des conditions de fermentation aérobie, en culture immergée.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le composé à hydroxyler est ajouté directement au milieu de culture lorsque la croissance du microorganisme est suffisante.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'incubation du composé à hydroxyler est faite avec des cellules préalablement lavées et remises en suspension dans un milieu en contenant pas de source de carbone ou d'azote.
5. Procédé d'hydroxylation selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'incubation s'effectue à une température comprise entre 20 et 30°C.
6. Procédé d'hydroxylation selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le pH du milieu de culture est compris entre 6 et 8 environ.