

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 00188

(54) Nouveaux composés macrolides à activité antibiotique, procédé et micro-organismes pour leur préparation, et compositions pharmaceutiques correspondantes.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 H 17/08; C 12 N 1/20; C 12 P 19/62
// C 12 R 1/48.

(22) Date de dépôt..... 8 janvier 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Italie, 9 janvier 1981, n° 19081 A/81.*

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 38 du 24-9-1982.

(71) Déposant : PIERREL SPA, résidant en Italie.

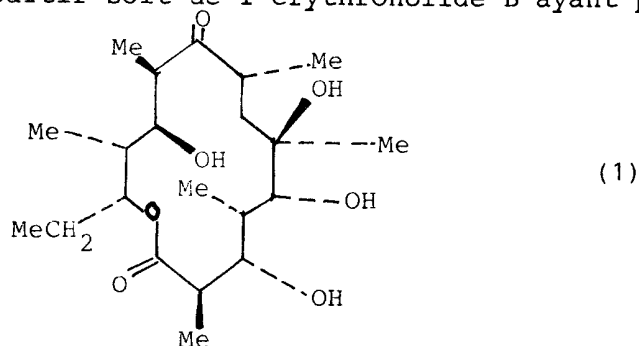
(72) Invention de : Leonardo M. Cappelletti, Roberto Spagnoli et Luciano Toscano.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

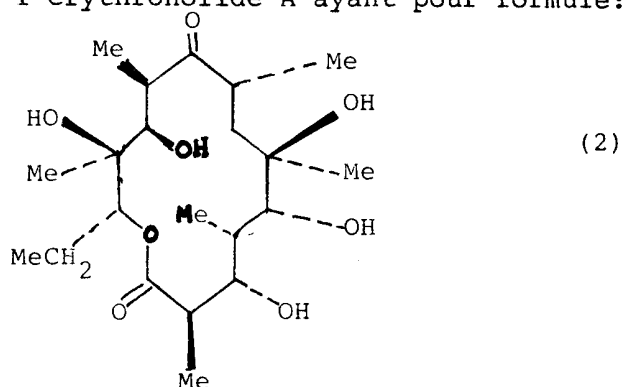
(74) Mandataire : Cabinet Pierre Loyer,
18, rue de Mogador, 75009 Paris.

Nouveaux composés macrolides à activité antibiotique, procédé et micro-organismes pour leur préparation, et compositions pharmaceutiques correspondantes.

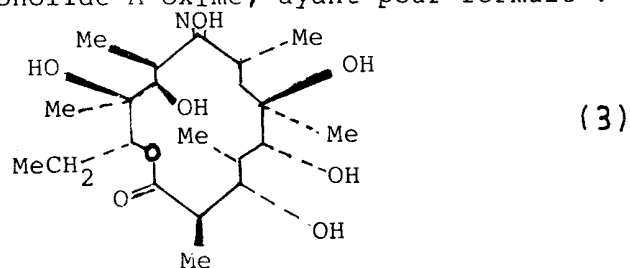
La présente invention concerne de nouveaux antibiotiques appartenant à la famille des macrolides. Plus spécifiquement, l'invention concerne de nouveaux antibiotiques macrolides obtenus à partir soit de l'érythronolide B ayant pour formule:



à savoir un substrat naturel qui est le précurseur biosynthétique de l'érythromycine A, soit de substrats semi-synthétiques tels que l'érythronolide A ayant pour formule:



et l'érythronolide A oxime, ayant pour formule :



Un autre objet de la présente invention est un nouveau micro-organisme, Streptomyces antibioticus ATCC 31771 obtenu par traitement mutagène du Streptomyces antibioticus ATCC 11891, producteur d'oléandomycine.

5 On sait que le Streptomyces antibioticus ATCC 11891 est capable d'utiliser un substrat semi-synthétique (érythronolide A oxime) (Le Mahieu et coll., J. Antib., 1976, XXIX (7), 728), mais non l'érythronolide B sus-mentionné, qui est un substrat que l'on peut obtenir par fermentation directe en
10 quantités notables, et de ce fait à des prix économiquement valables, en utilisant des micro-organismes producteurs d'érythromycine et leurs mutants.

D'un autre côté, on sait que l'érythromycine est fortement instable en ambiance acide, ce qui fait qu'il est nécessaire
15 de l'administrer sous forme d'esters et/ou de sels qui, bien qu'améliorant la stabilité, confèrent au principe actif des caractéristiques négatives et défavorables du point de vue thérapeutique, bien connues telles que l'hépatotoxicité, le bas niveau de tolérance et autres.

20 La même oléandomycine est d'ailleurs connue pour sa forte toxicité.

L'objet principal de la présente invention est de créer de nouveaux antibiotiques ayant une activité semblable à celle de l'érythromycine, mais qui soient exempts des incon-
25 vénients de cet antibiotique mentionné ci-dessus, et qui soient en particulier stables en ambiance acide et susceptibles d'être administrés directement sans avoir à recourir à des esters et/ou à des sels toxiques.

Un autre objet de la présente invention est de proposer
30 un procédé permettant d'obtenir ces antibiotiques à partir d'un nouveau micro-organisme, capable d'utiliser des substrats naturels et semi-synthétiques, en particulier l'érythronolide B. Un autre objet encore de la présente invention est de fournir une composition à activité antibiotique destinée au
35 traitement de maladies et de troubles provoqués par des germes et des bactéries sensibles à l'action de l'érythromycine et d'antibiotiques semblables à cette dernière.

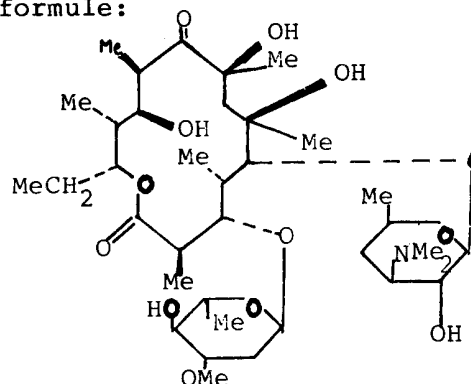
Ces objets sont atteints au moyen des nouveaux antibiotiques

macrolides et du procédé de préparation correspondant selon la présente invention, qui se caractérise par le fait qu'on utilise pour la fermentation, qui est conduite de façon connue en soi, un substrat choisi parmi l'érythronolide B, l'érythronolide A et l'érythronolide A oxime et, en tant qu'agent de fermentation, le Streptomyces antibioticus ATCC 31771.

Un autre aspect de l'invention concerne l'obtention de l'agent de fermentation sus-mentionné, à savoir le Streptomyces antibioticus ATCC 31771 qui est dérivé du Streptomyces antibioticus ATCC 11891 par traitement mutagène par rayons ultraviolets, avec un maximum d'émission à 254 nm et selon une dose permettant de tuer environ 99,6% des spores, le micro-organisme désiré étant en outre caractérisé par son incapacité à produire l'oléandomycine.

Examinant maintenant plus en détail les divers antibiotiques macrolides de la présente invention, ceux-ci seront individualisés selon la base du substrat au moyen duquel ils sont obtenus et sur la base des caractéristiques d'analyse chromatographique (la référence propre à la Demanderesse étant indiquée entre parenthèses).

1) 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy- (8S) 8hydroxyérythronolide B (P15148) de formule:

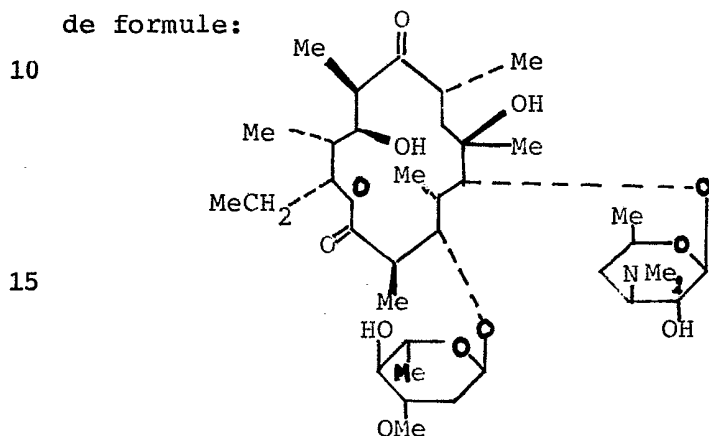


Cette substance est obtenue avec le micro-organisme de l'invention à partir d'érythronolide B; l'analyse chromatographique sur couche mince (TLC) fait ressortir un R_{st} de 0,8 par rapport à l'oléandomycine et un R_{st} de 0,75 par rapport à l'érythromycine A. Quand on utilise le réactif à l'anisaldéhyde

(pour lequel l'oléandomycine se colore en violet et l'érythromycine A en marron) cet antibiotique apparaît de couleur pourpre.

En HPLC (chromatographie en phase liquide à haute pression), le pic correspondant à P 15148 a une durée de rétention par rapport à l'érythromycine A de 0,69 et par rapport à l'oléandomycine de 1,08.

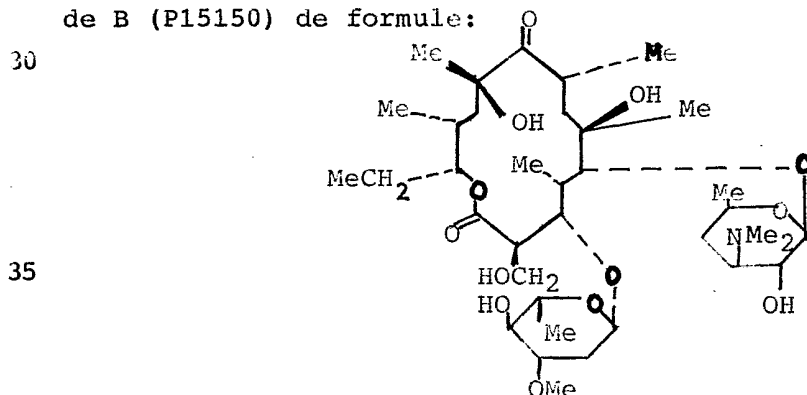
2) 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminylérythronolide B (P15149) de formule:



20 Ce produit est également obtenu par fermentation de l'érythronolide B, et il présente un R_{st} de 0,9 par rapport à l'oléandomycine et un R_{st} de 0,85 par rapport à l'érythromycine A. Quand on effectue l'essai à l'anisaldéhyde, cette substance devient également de couleur violette. En HPLC, le

25 pic correspondant à P 15149 a une durée de rétention par rapport à l'érythromycine A de 0,79 et par rapport à l'oléandomycine de 1,22.

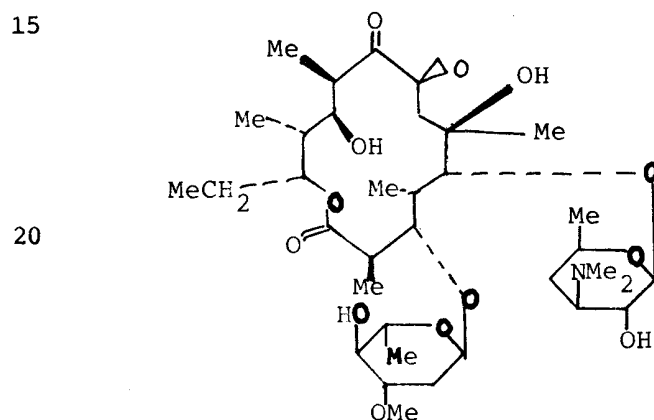
3) 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminyl-16-hydroxyérythronolide B (P15150) de formule:



Ce produit est dérivé par fermentation avec Streptomyces antibioticus ATCC 31771 à partir d'érythronolide B en tant que substrat et il présente un R_{st} de 0,47 par rapport à l'oléandomycine et un R_{st} de 0,44 par rapport à l'érythromycine A. L'essai à l'anisaldéhyde donne un produit de couleur pourpre. En HPLC, le pic correspondant à P 15150 a une durée de rétention par rapport à l'érythromycine A de 0,52 et par rapport à l'oléandomycine de 0,80.

Bien que la structure du nouvel antibiotique macrolide P 15150 n'ait pas été établie avec certitude, les données chimico-physiques obtenues suggèrent la structure probable indiquée ci-dessus.

4) 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminyl-(8R)-8,19-époxyérythronolide (P 15153) de formule:



Ce produit est obtenu par fermentation avec le micro-organisme de l'invention à partir de l'érythronolide B; à l'analyse chromatographique sur couche mince (TLC), il présente un R_{st} de 0,8 par rapport à l'oléandomycine et un R_{st} de 0,75 par rapport à l'érythromycine A. Quand on utilise le réactif anisaldéhyde, cet antibiotique apparaît de couleur violette.

A l'HPLC, le pic correspondant P 15153 a une durée de rétention par rapport à l'érythromycine A de 0,64 et par rapport à l'oléandomycine de 0,99. Pour ces quatre antibiotiques, obtenus en mélange à partir de l'érythronolide B, et après 100 heures de fermentation et avant isolement, l'activité antibiotique totale exprimée comme activité de

l'érythromycine A est d'environ 120-150 mcg/ml.

5) P 15151: on obtient cette substance par fermentation avec Streptomyces antibioticus ATCC 31771 à partir d'érythronolide A et elle présente un Rf de 0,88 par rapport à l'oléandomycine et un Rf de 0,8 par rapport à l'érythromycine A.

On constate par analyse du bouillon de culture, après 90 heures de fermentation, une activité antibiotique exprimée comme activité de l'érythromycine A d'environ 70 mcg/ml.

6) P 15152: Cette substance qui est obtenue de l'érythronolide A oxime présente un Rf de 0,47 par rapport à l'oléandomycine et de 0,44 par rapport à l'érythromycine A.

On constate par l'analyse du bouillon de culture, après 90 heures d'incubation, une activité antibiotique totale d'environ 50 mcg/ml, (exprimée comme activité de l'érythromycine A), cette activité étant toutefois rapportée au mélange de P 15152 et d'un autre antibiotique obtenu de façon concomitante et qui est le même que celui déjà décrit dans J. Antib. (1976), 29, 728.

Si on considère maintenant les nouveaux antibiotiques macrolides obtenus selon la présente invention, ils se caractérisent tous par un spectre bactériostatique semblable à celui de l'érythromycine et par la stabilité en ambiance acide, ce qui fait qu'il est possible de les administrer directement par voie orale, sans avoir à recourir à des esters et/ou à des sels qui entraînent les inconvénients et les problèmes déjà mentionnés. Ceci est confirmé au Tableau 1 qui suit, dans lequel sont consignées les valeurs de la concentration inhibitrice minimale (MIC), qui indiquent le pouvoir bactériostatique, et au Tableau 2 qui fournit par contre la stabilité en ambiance acide. Sans que cela doive être pris dans un sens limitatif, il semble plausible d'attribuer la plus grande stabilité des antibiotiques macrolides selon l'invention à la présence dans la molécule de l'antibiotique du sucre neutre oléandrose) (J. Antib. (1976) XXIX (7), 728).

Pouvoir bactériostatique en terrain solide d'érythromycine A, d'érythromycine B, d'oléandomycine, P 15149, P15148, P15153, P15150 sur couches bactériennes aérobies et anaérobies, Gram positives et Gram négatives. Concentrations inhibitrices minimales exprimées en mcg/ml

MICROORGANISME	PRODUIT	ERYTHROMY- CINE A
1. AEROBIE		
A. Gram positives		
Staphylococcus aureus ATCC 6538 P LRP 39		0,049
" " " LRP 1400		0,049
" " " " 14154 LRP 78 °		> 25
Streptococcus faecalis LRP 7		0,097
" " " sub. zymogenes ATCC 12958 LRP 61		0,195
" " pneumoniae ATCC 6303 LRP 35		0,012
" " " " LRP 52		0,012
" " " " LRP 53		0,012
" " pyogenes ATCC 8668 LRP 34		0,012
" " " " LRP 197		0,012
Corynebacterium diphtheriae LRP 24		0,006
Micrococcus luteus ATCC 9541 LRP 6		0,006
" " " ATCC 15957 LRP 193 °		> 25
Bacillus subtilis LRP 25		0,049
B. Gram négatives		
Haemophilus influenzae ATCC 19418 LRP 213		3,12
Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424 LRP 214		0,049
Escherichia coli LRP 50		6,25
Klebsiella pneumoniae LRP 54		25
Proteus vulgaris ATCC 6380 LRP 13		> 25
Pseudomonas aeruginosa LRP 9		> 25
Salmonella typhi LRP 8		12,5
Shigella sonnei LRP 5		12,5
Acholeplasma laidlawii ATCC 23206 LRP 204		0,097
Mycoplasma hominis I ATCC 14027 LRP 211		> 25

TABLEAU 1 (Suite)

MICROORGANISME	PRODUIT	Erythro mycine B	Oléando mycine	P 15149	P 15148	P 15153	P 15150
1. AEROBIE							
A. GRAM positives							
	LRP 39	0,097	0,39	0,78	1,56	0,195	3,12
	LRP 14	0,195	0,39	0,78	1,56	0,195	3,12
	LRP 78	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
	LRP 7	0,195	1,56	0,78	0,78	0,78	0,25
	LRP 61	0,195	1,56	0,78	0,78	0,39	3,12
	LRP 35	0,024	0,195	0,097	0,195	0,049	0,195
	LRP 52	0,024	0,195	0,097	0,195	0,049	0,195
	LRP 53	0,024	0,195	0,097	0,097	0,024	0,39
	LRP 34	0,024	0,195	0,097	0,195	0,049	0,097
	LRP 197	0,024	0,195	0,097	0,195	0,049	0,097
	LRP 24	0,012	0,097	0,049	0,097	0,024	0,097
	LRP 6	0,006	0,049	0,097	0,049	0,024	0,195
	LRP 193	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
	LRP 25	0,049	0,39	0,39	0,78	0,195	3,12
B. GRAM Négatives							
	LRP 213	6,25	> 25	6,25	> 25	12,5	> 25
	LRP 214	0,097	0,195	0,195	1,56	0,195	0,195
	LRP 50	25	> 25	> 25	> 25	25	> 25
	LRP 54	25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
	LRP 13	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
	LRP 9	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
	LRP 8	25	> 25	> 25	25	25	25
	LRP 5	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
	LRP 204	0,097	6,25	12,5	6,25	1,56	6,25
	LRP 211	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25

Légende : ° Erythromycine résistante

°° Pénicilline résistante

TABLEAU 1 (Suite)

MICROORGANISME	PRODUIT	Erythro	Erythro	Oléan-	P	P	P	P
		mycine A	mycine B	domy cine	15149	15148	15153	15150
2. ANAEROBIE								
Clostridium Perfringens ATCC 3624	LRP 206	1,56	1,56	3,12	12,5	>25	3,12	6,25
Bacteroides fragilis ATCC 23745	LRP 205	0,195	0,195	0,39	3,12	6,25	6,25	>25
Fusobacterium necrophorum ATCC 27852	LRP 210	1,56	6,25	6,25	>25	>25	25	>25

TABEAU 2 - Stabilité en ambiance acide à 25°C des nouveaux antibiotiques par rapport à l'érythromycine A.
érythromycine A

5	pH	2,0	3,0	4,0
	t 1/2 (minutes)	2	6	120
P 15148				
10	pH	2,0	3,0	4,0
	t 1/2 (heures)	27	>100	>100
P 15149				
15	pH	2,0	3,0	4,0
	t 1/2 (heures)	18	>100	>100
P 15150				
20	pH	2,0	3,0	4,0
	t 1/2 (heures)	>100	>100	>100
P 15153				
25	pH	2,0	3,0	4,0
	t 1/2 (heures)	65	>100	>100

NOTA BENE: t 1/2 représente la durée par deux de diminution
l'antibiotique déterminée par chromatographie en phase liqui-
de à haute pression (HPLC).

Les exemples qui suivent illustrent à titre non limitatif
la préparation du micro-organisme Streptomyces antibioticus
ATCC 31771, et des nouveaux antibiotiques de l'invention.

EXEMPLE 1

Obtention du mutant Streptomyces antibioticus ATCC 31771
Une suspension de spores de Streptomyces antibioticus
ATCC 11891 producteur d'oléandomycine a été soumise à un
traitement mutagène par rayons ultraviolets (maximum d'émission

à 254 nm) pour une dose permettant de tuer environ 99,6% des spores (environ 3000 erg/cm²).

Les spores survivants ont été disposés sur une plaque sur un terrain nutritif et les colonies en résultant ont été
5 analysées du point de vue de leur incapacité à produire l'oléandomycine en utilisant la technique décrite par A. KELNER (1949) J. Bact. 57, 73.

Les mutants bloqués dans la synthèse de l'oléandomycine (environ 2% des survivants) ont été ensuite analysés du point
10 de vue de leur capacité à reconnaître et à transformer les substrats d'érythronolide B, d'érythronolide A et d'érythronolide A oxime dans des nouveaux composés à activité antibiotique.

EXEMPLE 2

15 Préparation des antibiotiques: 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy-(8S)8hydroxyérythronolide B (P15148), 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminyérythronolide B (P15149), 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy-(8R)-8,19-époxyérythronolide (P 15153) et P 15150.

20 Procédé A

Le mutant Streptomyces antibioticus ATCC 31771 est maintenu sur culture sur gélose inclinée ("slants") du terrain suivant:

	- Peptone	0,2	grammes	pour 100 ml
25	- Glycérine	0,5	"	"
	- Mélasse de canne	0,5	"	"
	- K ₂ HPO ₄	0,1	"	"
	- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05	"	"
	- NaCl	0,5	"	"
30	- FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001	"	"
	- CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002	"	"
	- Agar	2,0	"	"
	- eau distillée	q.s.	pour volume	
	- pH corrigé à 7,0			

35 On inocule au moyen d'une prise de spores provenant d'un "slant" un matras Erlenmeyer de 500 ml contenant 50 ml de terrain végétatif ayant la composition suivante:

- dextrose	1,5	grammes	pour	100	ml
- farine de soja	3,0	"	"	"	"
- autolysat de levure	0,1	"	"	"	"
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	"	"	"	"
5 - calcium carbonate	1,0	"	"	"	"
- huile de soja	0,6	"	"	"	"
- eau distillée	q.s.	pour	volume		

Le matras est soumis à incubation à 28°C sur secoueur rotatif tournant à 220 t.p.m. pendant 24 heures. Après cette
10 période, on inocule avec 15 ml de cette culture un fermentateur sous verre de 10 litres contenant 5 litres du terrain ci-dessus.

Ce fermentateur est soumis à incubation à 28°C, sous agitation de 800 t.p.m. et un flux d'air de 0,6 V/V/minute
15 pendant 16 heures. A la fin de cette période, on utilise 3,5 litres de cette culture pour inoculer un fermentateur en acier de 200 litres contenant 100 litres du terrain suivant:

- dextrose	2,5	grammes	pour	100	ml
- farine de soja	2,0	"	"	"	"
20 - levure de bière sèche	0,4	"	"	"	"
- farine de maïs	1,6	"	"	"	"
- calcium carbonate	3,0	"	"	"	"
- NaCl	0,3	"	"	"	"
- huile de lard	1,0	"	"	"	"
25 - eau du réseau	q.s.	pour	volume		

L'incubation est effectuée à 28°C sous agitation de 250 t.p.m. et une aération de 1 V/V/minute.

Après 32 heures de croissance, on ajoute à la culture 75 grammes d'érythronolide B et on poursuit l'incubation pendant
30 encore 68 heures.

A la fin de cette période, un échantillon du bouillon de culture est filtré et extrait à pH 8,5 avec un volume égal de CH_2Cl_2 .

L'extrait est analysé par TLC sur plaques au gel de
35 silice développées pendant 2 heures avec le système: CH_2Cl_2 : méthanol 95%: NH_4OH concentré (90:10:1). On effectue sur cette plaque une bioautographie contre *Micrococcus luteus* (*Sarcina lutea*) ATCC 9341, ou bien en variante les plaques peuvent

être aspergées avec un réactif à l'anisaldéhyde (0,5% V/V d'anisaldéhyde dans un mélange de méthanol: acide acétique glacial: acide sulfurique concentré (85:10:5) et chauffées à 120°C pendant 5 minutes.

5 Dans les conditions de fermentation sus-mentionnées, et parallèlement à l'utilisation de l'érythronolide B, on produit quatre nouvelles substances à activité antibiotique dénommées P 15148, P 15149, P 15150 et P 15153. En TLC, elles
10 présentent un R_{st} de 0,8; 0,9; 0,47 et 0,8 par rapport à l'oléandomycine. Par rapport à l'érythromycine A, ces R_{st} sont de 0,75; 0,85; 0,44 et 0,75. En utilisant le réactif à l'anisaldéhyde, les produits P 15148, P 15150 et P 15153
apparaissent sous une couleur pourpre, alors que le P 1549 est violet (l'oléandomycine devient violette alors que l'éry-
15 thromycine A devient marron). Un échantillon de l'extrait organique est contrôlé également à l'HPLC, et pour ce faire on l'évapore à sec, on le reprend à l'acétonitrile et on l'injecte en colonne (RP8 10 μ m 25 cm; phase mobile tampon
phosphate 0,01 M, pH7/acétonitrile 36:64; flux 2 ml/min.;
20 température colonne 40°C). On a mis en évidence pour les nouvelles substances P 15148, P 15149, P 15150 et P 15153 des pics avec des durées de rétention par rapport à l'érythromy-
cine A de 0,69; 0,79; 0,52 et 0,64 et par rapport à l'oléan-
domycine de 1,08; 1,22; 0,80 et 0,99. Après 100 heures de
25 fermentation, l'activité antibiotique totale exprimée comme activité de l'érythromycine A est d'environ 120-150 mcg/ml. On réduit ensuite au minimum l'agitation en suspendant la distribution d'air et on abaisse la température à 15°C. On prépare une culture fermentative de Streptomyces erythreus
30 NRRL 2338 selon les conditions décrites dans la demande de brevet allemand publiée (OS) 1900647 du 13.8.1970. Par ad-
jonction de n-propanol à 4% V/V, après 144 heures de fermenta-
tion, on obtient dans le bouillon de culture environ 500 mcg/ml d'érythronolide B et des traces d'érythromycine (moins
35 de 20 mcg/ml).

A ce stade, la culture est soumise à centrifugation et le liquide limpide surnageant est stérilisé par filtration.

On prépare une culture végétative de Streptomyces

antibioticus ATCC 31771 selon les modalités décrites pour le procédé A.

On effectue un second passage végétatif selon les mêmes conditions en inoculant avec 1 ml de culture végétative un second matras Erlenmeyer de 500 ml contenant 50 ml du terrain végétatif de l'Exemple 2.

Avec 1,0 ml de culture du second végétatif, on inocule un matras Erlenmeyer de 500 ml contenant 30 ml du terrain fermentatif suivant:

10	- dextrose	5,0	grammes	pour	100	ml
	- farine de soja	2,0	"	"	"	"
	- levure de bière	0,2	"	"	"	"
	- farine de maïs	0,3	"	"	"	"
	- calcium carbonate	2,0	"	"	"	"
15	- eau du réseau	q.s.	pour	volume		

On fait incuber le matras à 28°C sur secoueur rotatif tournant à 250 t.p.m. Après 32 heures d'incubation, on ajoute au matras 10 ml du liquide limpide surnageant décrit ci-dessus et on poursuit l'incubation pendant encore 64 heures.

La culture est analysée selon les modalités décrites à l'Exemple 1. On obtient une activité antibiotique totale d'environ 30 mcg/ml (exprimée comme activité de l'érythromycine A) et on relève par HPLC la présence de quatre nouveaux antibiotiques P 15148, P 15149, P 15150 et P 15153 et des traces d'érythromycine A.

Dans les matras de contrôle où on a ajouté le filtrat contenant l'érythronolide B, l'activité antibiotique est absente.

EXEMPLE 3

Purification des antibiotiques 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy1-(8S)8hydroxyérythronolide B (P15148), 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy1érythronolide B (P15149), 3-0-oléandrosil-5-0-désosaminil-(8R)-8,19-époxyérythronolide (P 15153) et P 15150.

Au mélange de fermentation finale reporté à l'Exemple 2 (procédé A) sont ajoutés sous agitation 30 litres d'une solution de $ZnSO_4$ à 10% P/V et 30 litres de NaOH à 2% P/V dans l'eau.

Après adjonction d'un coadjuvant de filtration, les solides sont remis par filtration sur filtre rotatif sous vide après lavage en continu de ces substances sur le panneau du filtre.

5 Les solides lavés sont écartés, et à la fin de la filtration on récupère 150 litres de filtrat limpide.

Le filtrat est ensuite salé au moyen d'un sel approprié tel que NaCl, Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou autres, ajoutés à raison de 15-25% P/V pour faciliter l'extraction qui suit au moyen
10 d'un solvant approprié non miscible dans l'eau. Le pH du filtrat est corrigé entre 5,4 et 6,2 au moyen d'acides dilués, tels que l'acide phosphorique ou acétique.

Au cours de cette opération, il y a précipitation des solides inactifs qui sont éliminés par filtration.

15 Un solvant approprié non miscible dans l'eau tel que le butyle acétate, le chloroforme, le méthylisobutylcétone, le méthylène chlorure ou le dichloroéthane sont mis en contact au moyen d'un extracteur centrifuge fonctionnant en continu avec le filtrat limpide, selon un rapport compris entre 20 et
20 50% V/V.

L'opération est répétée deux fois et les phases organiques sont réunies l'une à l'autre. Les phases organiques réunies contiennent surtout P 15149. Dans la phase aqueuse sont présents P 15148, P 15150, P 15153 et P 15149 résidu,
25 non extrait complètement de la phase organique.

La phase organique (environ 100 litres) est distillée sous vide à basse température jusqu'à un volume d'environ 10 litres.

Sous agitation vigoureuse, on ajoute 3 litres de tampon
30 acétate 10^{-4}M à un pH d'environ 4,0 et les phases sont séparées successivement. L'opération est répétée trois fois et à la fin la totalité du P 15149 est présente dans la phase aqueuse; le solvant qui contient de nombreuses impuretés est éliminé.

35 Les phases aqueuses réunies sont portées à un pH d'environ 8,0 avec NaOH dilué et sont ensuite extraites en trois reprises au moyen de trois litres chacune d'un solvant organique tel que le méthylisobutylcétone ou le butylacétate.

La phase aqueuse est éliminée et les phases organiques sont réunies et desséchées sur Na_2SO_4 anhydre.

La solution desséchée est distillée sous vide à basse température jusqu'à un volume de 500 ml.

5 A 5 litres d'un solvant non polaire tel que l'hexane ou l'éther de pétrole réchauffés à environ 40°C sont ajoutés, sous agitation, 500 ml de la solution concentrée; l'adjonction est terminée après environ 1 heure.

A la fin de l'adjonction, on met fin au réchauffement et
10 on refroidit lentement jusqu'à $+5^\circ\text{C}$.

Après environ 2 heures à cette température, la précipitation de P 15149 qui avait déjà commencé à 18°C se termine.

Le précipité blanc et floconneux est filtré, lavé avec un solvant et séché, en obtenant 4,2 g de P 15149 dont la pureté,
15 déterminée par contrôle HPLC, est de 85%.

Pour obtenir un échantillon analytiquement pur, il faut ensuite purifier le solide par chromatographie de répartition en colonne sur gel de silice selon le procédé indiqué par N.L. Oleinick dans J. Biol. Chem., vol. 244, n° 3, page 277
20 (1969).

Les fractions 25-80 contenant seulement 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminylérythronolide B (P15149) sont réunies et évaporées à sec sous vide à 50°C , cristallisées par acétone-hexane pour donner 1,835 g de P 15149 présentant les caractéristiques suivantes:

p.f.: $128-131^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} -62,2^\circ$ (C=1 dans le méthanol)

UV (méthanol) 290 nm (ϵ 59.8)

IR (KBr) 3490, 1720, 1700 épaulement, 1460, 1380, 1335,
30 1275, 1250, (épaulement), 1180, 1160, 1105, 1075, 1050, 1000, 945, 920, 890, 830 cm^{-1} (figure 1).

L'analyse par $\text{C}_{36}\text{H}_{65}\text{NO}_{12}$ a donné les valeurs suivantes:
calculé (en pourcentage) C 61,43; H 9,30; N 1,99
trouvé (en pourcentage) C 61,34; H 9,38; N 2,05.

35 Les phases aqueuses contenant P 15148, P 15150, P 15153 et P 15149 (non extrait complètement) sont rendues basiques avec NaOH dilué, extraites plusieurs fois avec un volume égal de CH_2Cl_2 . Avant chaque extraction, le pH de la phase aqueuse

est amené à 9.

Par contrôle TLC et HPLC, il est possible de mettre en évidence les extraits contenant seulement l'antibiotique P 15150 (plus soluble que les autres en phase aqueuse) et les
5 extraits contenant encore P 15143, P 15149, P 15150 et P 15153 ensemble.

Les phases organiques contenant seulement P 15150 sont réunies et évaporées à sec sous vide à 50°C, pour donner 3,4 g de P 15150 présentant les caractéristiques physico-chimiques
10 suivantes:

$[\alpha]_D^{20} -55^\circ$ (C=1 dans le méthanol)

UV (méthanol) 288 nm (ϵ 42)

IR (KBr) 3460, 1715, 1700 (épaulement) , 1455, 1375, 1330, 1300, 1270, 1255, 1240, 1170, 1105, 1070, 1045, 1000, 990,
15 980, 940, 915, 885, 825 cm^{-1} (figure 2).

Le cholhydrate correspondant a un p.f. de 160-163°C (acétone)

L'analyse par $\text{C}_{36}\text{H}_{65}\text{NO}_{13}$, HCl a donné les valeurs suivantes:

20 calculé (en pourcentage) C 57,17; H 8,80; N 1,85; Cl 4,69
trouvé (en pourcentage) C 56,92; H 8,77; N 1,91; Cl 4,59

Les autres phases organiques contenant encore P 15150 et les restes antibiotiques sont évaporés à sec sous vide à 50°C et le résidu obtenu est purifié sur colonne de répartition en
25 gel de silice selon le procédé de N.L. Oleinick sus-mentionné.

Par élution au moyen du solvant indiqué dans le procédé, on recueille des fractions contenant seulement P 15149 (Fr 52-110), P 15148 (Fr 130-185), P 15153 (Fr 260-450). Quand il résulte des contrôles TLC et HPLC que les fractions éluées ne
30 contiennent plus de P 15153, on change le solvant de l'élution. En effectuant l'élution avec l'alcool isopropylique acétone (1:1.5), on recueille des fractions contenant seulement l'antibiotique P 15150.

Les fractions 52-110 réunies et évaporées à sec sous vide
35 à 50°C ont donné 0,425 g de 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminylérythronolide B (P15149) après cristallisation par acétone-n hexane, avec des caractéristiques chimico-physiques égales à celles indiquées pour P 15149 isolé précédemment.

Les fractions 130-145 réunies et évaporées à sec sous vide à 50°C ont donné 3,2 g de 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy 1-(8S)-8hydroxyérythronolide B (P15148) après cristallisation par acétone, caractérisé par:

- 5 p.f. 204-6°C
 $[\alpha]_D^{20} -48.35^\circ$ (C=1 dans le méthanol)
 UV (méthanol) 280 nm (ϵ 39.2)
 IR (KBr) 3590, 3520, 3440 (large), 3280 (large), 1725, 1455, 1380, 1365, 1305, 1280, 1270, 1260, 1175, 1155, 1095, 1060,
 10 1050, 1020, 1005, 970, 935, 915, 885, 875, 820 cm^{-1} (figure 3).

L'analyse par $\text{C}_{36}\text{H}_{65}\text{NO}_{13}$ a donné les valeurs suivantes:
 calculé (en pourcentage) C 61,43; H 9,30; N 1,99
 trouvé (en pourcentage) C 61,34; H 9,38; N 2,05

- 15 Les fractions 260-450 réunies et évaporées à sec sous vide à 50°C ont donné 10,3 g de 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy 1-(8R)-8,19-époxyérythronolide (P 15153) après cristallisation par acétone-n hexane, avec les caractéristiques chimico-physiques suivantes:

- 20 p.f. 125-130°C
 $[\alpha]_D^{20} -27,7^\circ$ (C = 1 dans le méthanol)
 UV (méthanol) 288 nm (ϵ = 42)
 IR (KBr) 3485, 1720, 1460, 1380, 1330, 1305, 1270, 1170, 1140, 1110, 1075, 1050, 1000, 930, 920, 890, 830 cm^{-1}
 25 (figure 4).

L'analyse par $\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{NO}_{13}$ a donné les valeurs suivantes:
 calculé (en pourcentage) C 60,23; H 8,85; N 1,95
 trouvé (en pourcentage) C 60,12; H 8,75; N 1,79

- 30 Par évaporation sous vide à 50°C des fractions recueillies avec l'alcool isopropylique acétone (1:1.5) et cristallisation successive par acétone-n hexane, on obtient 15,4 g de P 15150 présentant les mêmes caractéristiques que précédemment.

EXEMPLE 4

Préparation de l'antibiotique P 15151.

- 35 A une culture fermentative en matras de Streptomyces antibioticus ATCC 31771 préparée et décrite à l'Exemple 2, on ajoute après 30 heures d'incubation 15 mg d'érythronolide A préparé à partir d'érythromycine A selon la technique décrite

dans J. Med. Chem. (1974), 17, 953.

Après encore 60 heures d'incubation, on analyse le bouillon de culture comme décrit à l'Exemple 2 et on relève une activité antibiotique d'environ 70 mcg/ml (exprimée comme 5 activité de l'érythromycine A).

Par contrôle TLC, on détecte une nouvelle substance active, P 15151, ayant un Rf de 0.8 par rapport à l'érythromycine A et de 0.88 par rapport à l'oléandomycine.

Ce composé est par ailleurs différent des antibiotiques P 10 15148, P 15149, P 15150 et P 15153.

EXEMPLE 5

Préparation de l'antibiotique P 15152.

A un matras de Streptomyces antibioticus ATCC 31771, préparé selon la procédure décrite à l'Exemple 4, on ajoute, 15 après 30 heures d'incubation, 15 mg d'érythronolide A oxime préparé conformément à la description donnée dans J. Med. Chem. (1974), 17, 953.

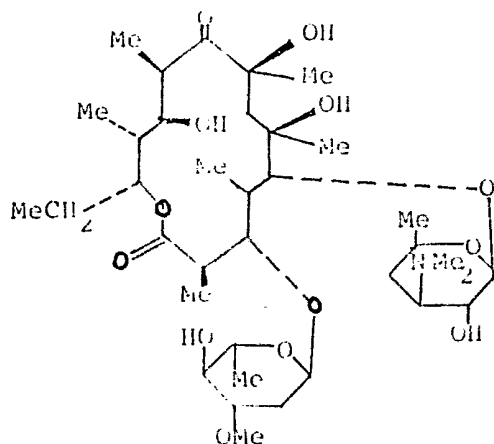
Après encore 60 heures d'incubation, on analyse le bouillon de culture comme décrit à l'Exemple 2 et on constate une 20 activité antibiotique totale d'environ 50 mcg/ml (exprimée comme activité de l'érythromycine A).

Le contrôle TLC permet de détecter deux substances actives parmi lesquelles l'une est celle décrite dans J. Antib. (1976), 29, 728 (Rf 0.73 par rapport à l'oléandomycine), 25 alors que la seconde est nouvelle et dénommée P 15152 et présente un Rf de 0.47 (par rapport à l'oléandomycine) et de 0.44 (par rapport à l'érythromycine A).

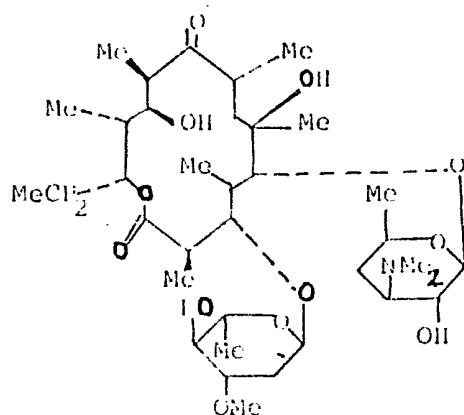
Il convient de préciser que les autres applications possibles du Streptomyces antibioticus ATCC 31771 sont couvertes par le champ d'application de la présente invention, dans 30 le sens de l'introduction dans lamolécule de précurseurs, nouveaux ou déjà connus, d'antibiotiques macrolides, l'oléandrose constituant l'agent conférant la stabilité en ambiance acide et en favorisant donc l'administration par voie orale.

REVENDICATIONS

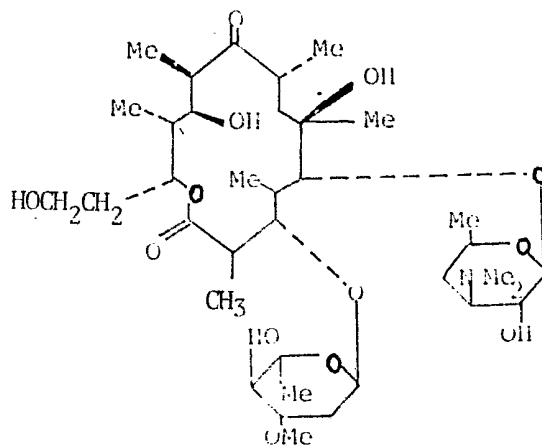
1. Nouveau composé 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy1-(8S)-8-hydroxyérythronolide B, ayant la formule suivante :



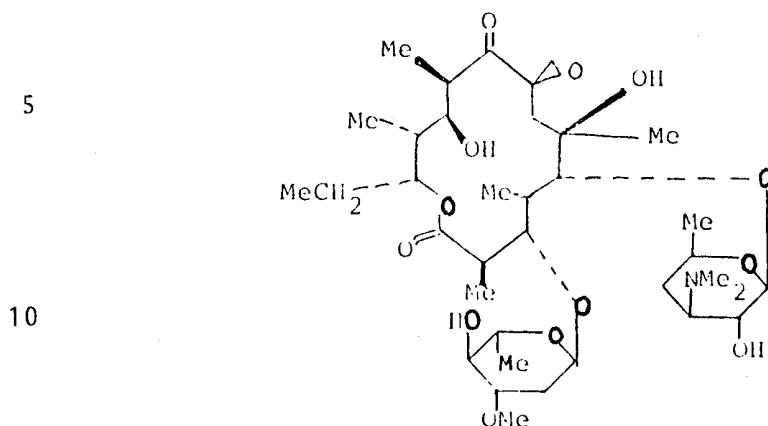
2. Nouveau composé 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy1érythronolide B, ayant la formule suivante :



3. Nouveau composé 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminy1-15-hydroxyérythronolide B, ayant la formule suivante :



4. Nouveau composé 3-0-oléandrosyl-5-0-désosaminyl-(8R)-8,19-époxyérythronolide, ayant la formule suivante :



5. Nouvel antibiotique macrolide, constitué essentiellement par le nouveau composé de la revendication 1.

6. Nouvel antibiotique macrolide, constitué essentiellement par le nouveau composé de la revendication 2.

7. Nouvel antibiotique macrolide, constitué essentiellement par le nouveau composé de la revendication 3.

20 8. Nouvel antibiotique macrolide, constitué essentiellement par le nouveau composé de la revendication 4.

9. Procédé de préparation des composés selon les revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'on prépare un bouillon de culture végétatif de Streptomyces antibioticus ATCC 31771, et dans le cas d'une fermentation réalisée de façon connue en soi, en ce qu'on lui ajoute un substrat choisi parmi l'érythronolide B, l'érythronolide A et l'érythronolide A oxime, procédant ensuite à l'isolement des antibiotiques individualisés séparément par des techniques de TLC et similaires.

30 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit substrat est de l'érythronolide B et en ce que l'incubation est réalisée pendant 100 heures, suite à quoi on constate dans un échantillon du bouillon de culture la présence et l'identité des antibiotiques produits, au moyen de TLC et de bioautographie ou encore en vaporisant les plaques avec un réactif à l'anisaldéhyde, le bouillon de fermentation étant ensuite soumis à filtration, salage et extraction au moyen d'un solvant organique, avec séparation d'une phase aqueuse et d'une phase organique.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on isole de la phase organique, au moyen d'opérations connues en soi, l'antibiotique macrolide selon la revendication 7, ayant un R_{st} de 0,9 par rapport à l'oléandomycine et un R_{st} de 0,85 par rapport à l'érythromycine A, et de couleur violette quand il est soumis à essai au moyen du réactif à l'anisaldéhyde.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'on isole de la phase aqueuse, par des opérations d'extraction avec solvant et par différence de solubilité, les antibiotiques macrolides selon l'une des revendications 5, 7 ou 8, ayant respectivement un R_{st} de 0,8 ; 0,47 ; 0,7 par rapport à l'oléandomycine et un R_{st} de 0,75 ; 0,44 et 0,75 par rapport à l'érythromycine A, et coloré en pourpre quand ils sont soumis à essai avec un réactif à l'anisaldéhyde.

13. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est préparé un bouillon de culture végétatif de Streptomyces antibioticus ATCC 31771 et en ce qu'au cours d'une fermentation réalisée d'une manière connue en soi, on ajoute de l'érythronolide A, puis on procède à l'incubation pendant encore 60 heures suite à quoi, après contrôle et individualisation des antibiotiques produits par la fermentation, on procède à leur isolement.

14. Nouvel antibiotique macrolide P 15151, obtenu par le procédé selon la revendication 13, ayant un R_f de 0,8 par rapport à l'érythromycine A et un R_f de 0,88 par rapport à l'oléandomycine.

15. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on prépare un bouillon de culture végétatif de Streptomyces antibioticus ATCC 31771 et en ce qu'au cours d'une fermentation réalisée d'une manière connue en soi, on ajoute de l'érythronolide A oxime, et en ce qu'on procède à l'incubation pendant encore 60 heures, suite à quoi, après individualisation et contrôle des antibiotiques produits par la fermentation, on isole les antibiotiques ainsi obtenus.

16. Nouvel antibiotique macrolide P 15152, obtenu par le procédé selon la revendication 15, ayant un R_f de 0,47 par rapport à l'oléandomycine et un R_f de 0,44 par rapport à l'érythromycine A.

17. Procédé de préparation du Streptomyces antibioticus ATCC 31771 selon la revendication 9, caractérisé en ce que des spores d'une souche de Streptomyces antibioticus producteur d'oléandomycine sont soumis à un traitement mutagène
5 par des rayons ultraviolets à une dose permettant de tuer au moins 99 % des spores et les spores restant étant sélectionnées sur la base de l'incapacité à produire l'oléandomycine et la capacité de reconnaître et de transformer les substrats choisis dans la classe comprenant l'érythronolide
10 B, l'érythronolide A et l'érythronolide A oxime.

18. Procédé de préparation selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite souche qui est soumise à un traitement mutagène est le Streptomyces antibioticus ATCC 11891.

15 19. Procédé de préparation selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'irradiation est effectuée avec un maximum d'émission des rayons U.V. à 250 nm et selon un dosage d'environ 3000 erg/cm².

20 20. Streptomyces antibioticus ATCC 31771 préparé selon le procédé décrit dans les revendications 17 à 19, caractérisé par son incapacité à produire l'oléandomycine.

