



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

 (51) Int. Cl.³: C 07 D 493/10
 A 61 K 31/335

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



(12) FASCICULE DU BREVET A5

(11)

637 963

(21) Numéro de la demande: 2196/79

(22) Date de dépôt: 07.03.1979

 (30) Priorité(s): 16.03.1978 JP 53-30187
 16.03.1978 JP 53-30188

(24) Brevet délivré le: 31.08.1983

 (45) Fascicule du brevet
 publié le: 31.08.1983

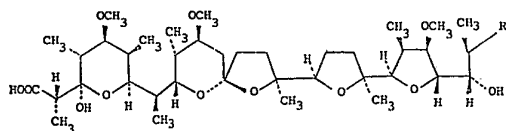
 (73) Titulaire(s):
 Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo (JP)

 (72) Inventeur(s):
 Michio Yamagishi, Tokorozawa/Saitama (JP)
 Kazutoshi Mizoue, Urawa/Saitama (JP)
 Taku Mizutani, Ageo/Saitama (JP)
 Hiroshi Hara, Kitamoto/Saitama (JP)
 Sadafumi Omura, Ageo/Saitama (JP)
 Haruo Seto, Hachioji/Tokyo (JP)
 Noboru Otake, Yokohama/Kanagawa (JP)

 (74) Mandataire:
 William Blanc & Cie conseils en propriété
 industrielle S.A., Genève

(54) Dérivés de lonomycine à activités anti-bactériennes, anti-virales et anti-protozoaires.

(57) On décrit des dérivés de lonomycine de formule générale:

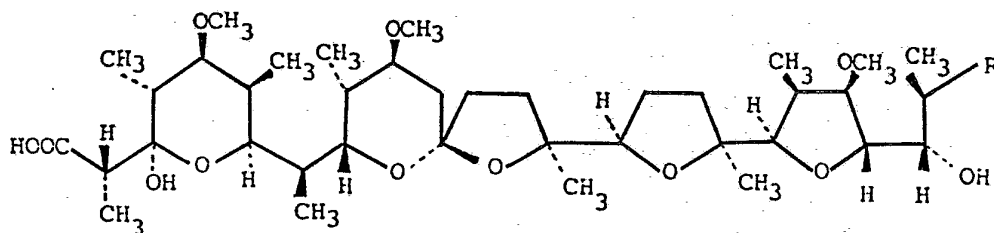


où le R est le groupe 2-méthyl-3-oxo-1-butényle ou 3-hydroxy-1-méthoxy-2-méthylbutyle; ces dérivés sont préparés par réaction de lonomycine ou de son sel avec un alcali ou un borohydrure de métal alcalin.

Ces dérivés présentent des activités anti-bactériennes, anti-virales et anti-protozoaires qui sont efficaces avec une toxicité diminuée par comparaison avec la lonomycine.

REVENDICATIONS

1. Dérivés de lonomycine, caractérisés en ce qu'ils sont représentés par la formule générale:



où R est le groupe 2-méthyl-3-oxo-1-butényle ou 3-hydroxy-1-méthoxy-2-méthylbutyle, et leurs sels.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R est le groupe 2-méthyl-3-oxo-1-butényle, et les sels de ce composé.

3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que R est

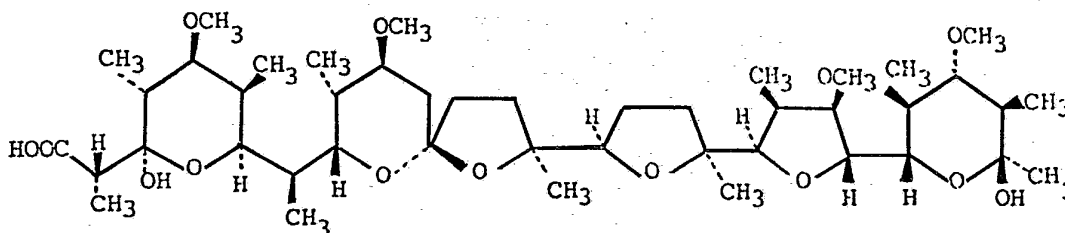
le groupe 3-hydroxy-1-méthyl-2-méthylbutyle, et les sels de ce composé.

4. Composition pharmaceutique, notamment à activité antibactérienne, antivirale et antiprotozoaire, caractérisée en ce qu'elle renferme, comme ingrédient actif, au moins un des dérivés de lonomycine selon la revendication 1.

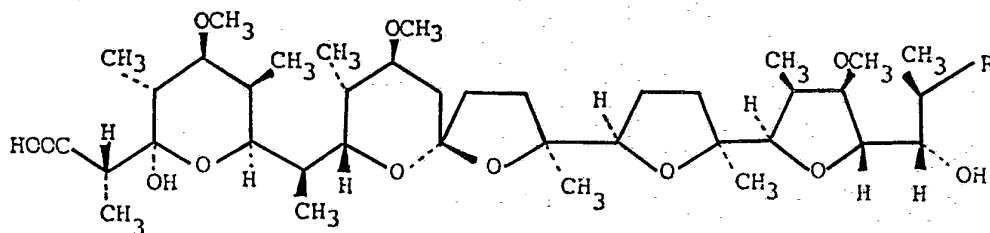
La présente invention se rapporte à de nouveaux dérivés de lonomycine.

La lonomycine, à partir de laquelle les nouveaux composés de la présente invention sont préparés, est un antibiotique du type poly-
éther produit par le *Streptomyces ribosidificus* TM-481 (ATCC

N° 31051) décrit dans «J. of Antibiotics», 29, N° 1, 15-20 (1976), et est aussi désignée sous le nom d'antibiotique TM-481. Cet antibiotique a une activité vis-à-vis des bactéries Gram positifs et vis-à-vis des protozoaires, tels que le coccidium, et est représenté par la formule:



La présente invention se rapporte à de nouveaux dérivés de lonomycine. Plus particulièrement, la présente invention concerne les nouveaux composés représentés par la formule:



(I)

où R est le groupe 2-méthyl-3-oxo-1-butényle ou 3-hydroxy-1-méthoxy-2-méthylbutyle, et leurs sels.

Un objet de la présente invention est de prévoir de nouveaux composés qui ont une activité antibactérienne, antivirale et antiprotozoaire, et qui présentent une toxicité inférieure à la lonomycine.

Dans la formule I, quand R est le groupe 2-méthyl-3-oxo-1-butényle, le composé illustré est désigné sous le nom d'oxolonomycine et, quand R est le groupe 3-hydroxy-1-méthoxy-2-méthylbutyle, le composé illustré est désigné sous le nom de dihydroxylonomycine. Les sels des composés représentés par la formule I comprennent les sels de métaux alcalins correspondants, tels que les sels de sodium et de potassium, les sels des métaux alcalino-terreux correspondants, tels que les sels de baryum et de magnésium, et les sels d'ammonium substitués et non substitués correspondants.

L'oxolonomycine de la présente invention peut être préparée par le procédé suivant: dans un solvant organique miscible à l'eau, tel que l'acétone et la méthyléthylcétone, on dissout la lonomycine ou son sel qui peut être préparé en traitant la lonomycine avec une base de métal alcalin, une base de métal alcalino-terreux, ou une base d'ammonium substitué ou non substitué, d'une manière connue en

soi. Une solution aqueuse d'un alcali, tel que la soude et la potasse, peut être ajoutée à la solution résultante pour régler le pH jusqu'à 11 ou au-dessus. On laisse le mélange reposer à la température ambiante pendant 20 à 50 h pour donner le sel d'oxolonomycine comme précipité. Le précipité peut être rassemblé par filtration et purifié par cristallisation.

Le sel d'oxolonomycine ainsi obtenu peut être transformé en oxolonomycine sous forme d'acide libre par un procédé classique en soi. Par exemple, le sel d'oxolonomycine est dissous dans un solvant organique, tel que le méthanol et l'acétone, et ajouté à une solution aqueuse d'un acide minéral, tel que l'acide chlorhydrique. Cette solution est extraite avec un solvant organique, tel que le benzène et le chloroforme, pour donner l'oxolonomycine sous forme d'acide libre. L'oxolonomycine ainsi obtenue peut être également transformée en sel désiré par traitement avec la base de métal alcalin, la base de métal alcalino-terreux ou une base d'ammonium substitué ou non substitué, d'une manière connue en soi.

La dihydroxylonomycine de la présente invention peut être préparée par réduction de la lonomycine ou du sel mentionné ci-dessus en utilisant un borohydrure de métal alcalin, tel que le borohydrure de

sodium et le borohydrure de potassium, dans un solvant inerte, tel que le dioxanne. La solution (après réglage du pH à environ 4 avec un acide minéral, tel que l'acide chlorhydrique, quand on utilise le sel de lonomycine comme matière de départ) est agitée à la température ambiante pendant 15 à 20 h. Après que le précipité formé a été retiré par filtration, le filtrat est dilué avec de l'eau et extrait avec un solvant organique, tel que du benzène. L'extrait est évaporé pour donner la dihydrolonomycine sous forme de poudre. Ce composé se compose de deux isomères optiques, désignés sous le nom de dihydrolonomycine I et de dihydrolonomycine II, présentant les valeurs de R_f de 0,38 et 0,17, respectivement, par chromatographie par couche mince sur une plaque de gel de silice dans un système de solvants benzène/acétone (2:1).

En outre, le sel de dihydrolonomycine peut être préparé par traitement de dihydrolonomycine avec une base de métal alcalin, une base de métal alcalino-terreux, ou une base d'ammonium substitué ou non substitué, d'une manière connue en soi, ou préparé par le procédé mentionné ci-dessus, mais sans traitement du sel de lonomycine avec l'acide minéral.

La dihydrolonomycine ou son sel peut être séparé en isomère optique respectif par chromatographie sur colonne. Par exemple, le sel de dihydrolonomycine est dissous dans un mélange de benzène/acétone (3:1) et la solution résultante est appliquée à une colonne de gel de silice. Pour l'élution, on utilise le même solvant que celui décrit ci-dessus. Le sel de dihydrolonomycine I et le sel de dihydrolonomycine II sont élués suivant des fractions respectivement comprises entre 1,2 à 1,9 fois et 2,25 à 3,1 fois le volume de la colonne utilisée.

Les composés de la présente invention ainsi obtenus ont une excellente activité vis-à-vis des bactéries, spécialement les bactéries Gram positifs, vis-à-vis des virus, spécialement le virus de la maladie de Newcastle, et vis-à-vis des protozoaires, spécialement les espèces *Eimeria* et *Toxoplasma*. Une toxicité diminuée est un avantage important fourni par les composés de la présente invention.

La toxicité aiguë des composés de la présente invention, administrés par voie intrapéritonéale et intraveineuse à des souris mâles dites ddY (20-22 g), cette toxicité étant exprimée sous forme de DL₅₀, est présentée dans le tableau I.

(Tableau en tête de la colonne suivante)

Les composés de la présente invention peuvent être utilisés comme agents anticoccidies. Pour le contrôle de la coccidiose dans la volaille, une quantité non toxique anticoccidies du composé de la présente invention est administrée aux volatiles, de préférence par voie orale sur une base quotidienne. Dans le cas de l'administration orale, les composés de la présente invention peuvent être fournis avec une substance capable d'être consommée par les volatiles, de préférence, l'alimentation de ces volatiles.

Le taux d'administration, qui est efficace contre l'infection due à la coccidiose, est généralement dans la gamme de 100 à 700 ppm, de préférence 250 à 500 ppm, en poids par rapport à l'alimentation non pourvue de médicament. Le composé de la présente invention peut être utilisé éventuellement avec d'autres agents anticoccidies.

Tableau I
(Toxicité aiguë des dérivés de lonomycine)

Composés	DL ₅₀ (mg/kg)	
	Voie intrapéritonéale	Voie intraveineuse
Sel de sodium de dihydrolonomycine I	11,3	6,0
Sel de sodium de dihydrolonomycine II	15,2	10,8
Sel de sodium d'oxolonomycine	117	—
Sel de sodium de lonomycine	8,3	4,9

L'activité anticoccidies des composés de la présente invention est, en outre, illustrée par les tests impliquant l'*Eimeria tenella* chez les poussins.

Pour ces études, certains groupes de 5 poussins, âgés de 8 d, ont été alimentés avec un produit alimentaire contenant un composé de la présente invention, le sel de sodium d'oxolonomycine. Le produit alimentaire utilisé a la composition suivante:

47,0% de maïs
10,0% de farine d'orge
10,0% de son de riz dégraissé
10,0% de farine de soja
7,0% de farine de poisson
7,0% de son de blé
3,0% de farine de luzerne
3,0% de saccharose
3,0% de CaCO₃
0,5% de NaCl
0,5% de prémélange de vitamines

Après avoir été alimentés avec cette ration pendant 48 h, chaque poussin a été inoculé avec des oocystes sporulés d'*Eimeria tenella*. Les autres groupes de 5 poussins, âgés de 8 d, ont été alimentés avec le produit alimentaire qui ne contenait pas le composé expérimental. Un de ces groupes a été aussi inoculé avec l'*Eimeria tenella* après 48 h et servait de contrôle infecté. L'autre de ces groupes n'a pas été inoculé avec l'*Eimeria tenella* et servait de contrôle normal. La médication a été poursuivie pendant 7 d, après que les oocystes d'infection ont été administrés, puis les résultats du traitement ont été évalués.

Les poussins ont été pesés, sacrifiés et examinés pour trouver des preuves de lésions dues aux coccidies. L'action des coccidies a été exprimée sur une échelle arbitraire, en passant de -1 (aucune évidence de coccidiose) à +4 (maximum d'action pour l'*Eimeria tenella*). Les résultats des tests sont présentés dans le tableau II.

Tableau II

	Evaluation sur les matières fécales	Evaluation des lésions					Gain de poids relatif (%)	Mortalité
		-	+	++	+++	++++		
Groupe sans administration de médicament, non infecté	-	5	0	0	0	0	100	0/5
Groupe sans administration de médicament, infecté	++	0	0	0	1	4	40,1	3/5
Groupe avec administration de médicament, 250 ppm	+	1	1	2	1	0	77,9	0/5
Groupe avec administration de médicament, 500 ppm	-	3	2	0	0	0	91,8	0/5

Evaluation des matières fécales	— : normales
	+ : diarrhée
Evaluation des lésions	++ : diarrhée avec sang
	— : état normal
	+ : peu importantes
	++ : léger degré
	+++ : degré moyen
	++++ : degré important

L'activité antitoxoplasmique des composés de la présente invention a été déterminée par le procédé suivant. Le macrophage, obtenu par voie intrapéritonéale à partir d'une souris, a été cultivé dans le milieu dit 199 contenant 20% de sérum de veau désactivé par la chaleur et a été mis en contact avec le *Toxoplasma tachyzoites* (ci-après désigné sous le nom de *T. tachyzoites*) pendant 1 h à 37°C. Ensuite, le *T. tachyzoites* non infecté a été retiré par lavage avec un tampon phosphaté, pH 7,2. Après que le macrophage infecté par le *T. tachyzoites* a été remis en suspension dans le milieu frais, le composé expérimental dissous dans l'éthanol a été ajouté à la suspension de macrophage. Le mélange résultant a été soumis à l'incubation avec aération à l'aide de 5% d'anhydride carbonique pendant 48 h à 37°C. Après formation de taches avec la matière colorante dite bleu tryptan, on a compté les *T. tachyzoites* ayant survécu dans le macrophage. Les résultats sont présentés dans le tableau III.

Tableau III

(Activité antitoxoplasmique de dérivés de lonomycine)

		Macrophage avec <i>T. tachyzoites</i>	
		1-5 Tp/ cellule*	≥ 6 Tp/ cellule**
Sel de sodium de dihydro-lonomycine I	0,1 µg	0	0
Sel de sodium de dihydro-lonomycine II	0,1 µg	9,4	5,8
Sel de sodium d'oxolonomycine	0,1 µg	0	0
Aucun produit		30,8	22,4

* pourcentage de macrophage contenant 1-5 *T. tachyzoites* par cellule** pourcentage de macrophage contenant 6 (ou plus) *T. tachyzoites* par cellule

Les composés de la présente invention ont une activité vis-à-vis du virus de la maladie de Newcastle. Cette activité a été déterminée par le procédé du test d'agglutination des globules rouges. Dans ce test, les globules ont été préparés à partir d'un embryon de poulet, vieux de 8 à 10 d, par un procédé ordinaire et cultivé dans le milieu essentiel minimum d'Eagles pour former une monocouche dans une bouteille de culture. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV

(Activité antivirale de dérivés de lonomycine)

Composés	Concentration d'inhibition minimale
Sel de sodium de dihydro-lonomycine I	3,1 µg/ml
Sel de sodium de dihydro-lonomycine II	3,1 µg/ml
Sel de sodium d'oxolonomycine	0,8 µg/ml

En outre, les composés de la présente invention présentent également une activité d'inhibition vis-à-vis des bactéries. La concentration d'inhibition minimale (CIM), à laquelle le composé expérimental inhibe diverses bactéries, déterminée par le test de dilution d'agar-agar, est résumée dans le tableau V. Dans ce test, les bactéries aérobies utilisées ont été amenées à se développer en stries (ou en bandes) sur un milieu d'agar-agar/infusion de cœur contenant diverses concentrations du composé expérimental. Les bactéries aérobies utilisées ont été amenées à se développer en stries (ou en bandes) sur des milieux dits GAM contenant diverses concentrations du composé expérimental et ont été soumises à l'incubation dans un incubateur à milieu anaérobie.

Tableau V

(Activité antibactérienne de dérivés de lonomycine)

	CIM (µg/ml)		
	Composé A	Composé B	Composé C
Bactérie anaérobie			
<i>Peptostreptococcus anaerobium</i>	25	6,25	3,13
<i>Peptostreptococcus productus</i>	12,5	3,13	3,13
<i>Peptococcus magnus</i>	1,56	1,56	1,56
<i>Fusobacterium varium</i>	> 100	> 100	> 100
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	> 100	> 100	> 100
<i>Bacteroides fragilis ss fragilis</i>	> 100	> 100	> 100
<i>Bacteroides fragilis ss distasonis</i>	> 100	> 100	> 100
<i>Bacteroides fragilis ss vulgatus</i>	> 100	> 100	> 100
<i>Propionibacterium acnes</i>	50	25	12,5
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	100	100	50
<i>Eubacterium lentum</i>	25	25	12,5
<i>Eubacterium limosum</i>	25	25	25
<i>Clostridium perfringens</i>	> 100	25	25
<i>Clostridium sporogenes</i>	25	25	25
<i>Clostridium botulinum</i>	25	12,5	12,5
<i>Clostridium sordellii</i>	12,5	12,5	6,25
<i>Clostridium tetani</i>	6,25	6,25	1,56
Bactérie aérobie			
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	100	50	50
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	> 100	> 100	> 100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	100	100	100

Composé A: sel de sodium de dihydro-lonomycine I

Composé B: sel de sodium de dihydro-lonomycine II

Composé C: sel de sodium d'oxolonomycine

Les exemples suivants sont prévus pour illustrer plus complètement la préparation des composés de la présente invention.

Exemple 1:

A une solution de 1,0 g de lonomycine dissoute dans 50 ml de dioxanne, 0,3 g de borohydrure de sodium a été ajouté avec agitation. Une quantité d'eau suffisante pour dissoudre le borohydrure de sodium a été ajoutée goutte à goutte. La solution a été agitée toute la nuit à la température ambiante. Après que le précipité formé a été retiré par filtration, le filtrat a été dilué avec 50 ml d'eau et extrait trois fois avec 50 ml de benzène. Les extraits benzéniques combinés

ont été lavés deux fois avec de l'eau, séchés avec du sulfate de sodium et évaporés à sec sous vide pour fournir 0,8 g de dihydro-lonomycine sous forme de poudre blanche.

La chromatographie sur couche mince du composé ainsi obtenu sur une plaque de gel de silice, dans du benzène/acétone (2:1), montre la présence de deux isomères optiques avec les valeurs de Rf de 0,38 et 0,17.

Exemple 2:

A une solution de 2,0 g de sel de sodium de lonomycine dissous dans 100 ml de dioxanne, on a ajouté 0,6 g de borohydrure de sodium. Une quantité d'eau suffisante pour dissoudre le borohydrure de sodium a été ajoutée goutte à goutte. La solution résultante a été réglée à un pH de 4 avec de l'acide chlorhydrique 1N, puis agitée toute la nuit à la température ambiante. Après que le précipité, qui a été formé, a été retiré par filtration, le filtrat a été dilué avec 100 ml d'eau, puis extrait trois fois avec 100 ml de benzène. Les extraits benzéniques combinés ont été lavés avec de l'eau et évaporés à sec pour donner 1,65 g de dihydro-lonomycine sous forme de poudre blanche. En utilisant la même chromatographie que celle décrite dans l'exemple 1, le composé ainsi obtenu présente des valeurs de Rf de 0,38 et 0,17.

Exemple 3:

1,5 g de dihydro-lonomycine, préparé comme décrit dans l'exemple 2, a été dissous dans 80 ml de méthanol/eau (3:1). Cette solution a été réglée à un pH de 10 par addition d'une solution aqueuse 0,1N de soude. La solution résultante a été évaporée à sec pour obtenir 1,5 g de sel de sodium de dihydro-lonomycine sous forme de poudre blanche.

Exemple 4:

1,0 g de sel de sodium de dihydro-lonomycine, préparé comme décrit dans l'exemple 3, a été dissous dans 5 ml de benzène/acétone (3:1) et appliqué sur une colonne de gel de silice (100 ml/7 remplie par le même solvant. Pour l'élution à partir de la colonne, on a utilisé le même solvant, et le sel de sodium de dihydro-lonomycine I et le sel de sodium de dihydro-lonomycine II sont élués suivant des fractions respectivement comprises entre 1,2 et 1,9 fois et entre 2,25 et 3,1 fois le volume de la colonne. Chaque fraction a été encore purifiée par filtration sur gel sur le produit Sephadex LH-20 et par cristallisation dans du méthanol pour donner à chaque fois des aiguilles blanches.

Sel de sodium de dihydro-lonomycine I: rendement: 0,35 g; point de fusion: 190-191,5°C; $[\alpha]_D^{25} = +23,6^\circ$ (c=1, méthanol).

Analyse élémentaire pour $C_{44}H_{77}O_{14}Na$:

Calculé: C 62,04 H 8,93 O 26,32 Na 2,70%

Trouvé: C 61,96 H 9,17 O 25,90 Na 2,64%

Valeur de Rf par chromatographie sur couche mince, plaque de gel de silice, benzène/acétone (2:1): 0,38.

Sel de sodium de dihydro-lonomycine II: rendement: 0,45 g; point de fusion: 160-162°C; $[\alpha]_D^{25} = +19,6^\circ$ (c=1, méthanol).

Analyse élémentaire pour $C_{44}H_{77}O_{14}Na$:

Calculé: C 62,04 H 8,93 O 26,32 Na 2,70%

Trouvé: C 61,18 H 9,09 O 25,85 Na 2,67%

Valeur de Rf par chromatographie sur couche mince, plaque de gel de silice, benzène/acétone (2:1): 0,17.

Exemple 5:

A une solution de 1,0 g de lonomycine dissous dans 30 ml d'acétone, on a ajouté 3 ml d'une solution aqueuse 3N de soude. Après mise au repos pendant 30 h à la température ambiante, le mélange a été mélangé avec 2 ml d'eau et maintenu à 5°C jusqu'à ce que suffisamment de précipité soit formé. Le précipité a été rassemblé par filtration et recristallisé dans une solution aqueuse de méthanol pour donner 760 mg de sel de sodium d'oxolonomycine sous forme d'aiguilles blanches.

Point de fusion: 199-200°C; $[\alpha]_D^{25} = +28,8^\circ$ (c=1, méthanol).

Analyse élémentaire pour $C_{43}H_{71}O_{13}Na$:

Calculé: C 63,06 H 8,74 O 25,40 Na 2,81%

Trouvé: C 62,95 H 8,72 O 25,18 Na 2,90%

UV_{max} 231 mμ ($E_{1\%}^{1cm}$ 170, MeOH).

Exemple 6:

A une solution de 1,4 g de sel de sodium de lonomycine dissous dans 50 ml d'acétone, on a ajouté avec agitation 20 ml d'une solution aqueuse 1N de soude. Après un moment, le mélange s'est séparé en deux couches. La couche inférieure a été retirée et on a laissé la couche supérieure reposer pendant 2 d à la température ambiante et pendant encore 1 d à 5°C. Le précipité formé a été rassemblé par filtration et recristallisé dans une solution aqueuse de méthanol pour donner 950 ml de sel de sodium d'oxolonomycine sous forme d'aiguilles blanches.

La présente invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation qui viennent d'être décrits; elle est au contraire susceptible de variantes et de modifications qui apparaîtront à l'homme de l'art.