

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

②①

N° 80 16814

⑤④ **Nouvel antibiotique antitumoral NCS-C et son procédé de préparation.**

⑤① **Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 P 1/04; A 61 K 35/74.**

②② **Date de dépôt..... 30 juillet 1980.**

③③ ③② ③① **Priorité revendiquée : Japon, 9 octobre 1979, n° 130181/1979.**

④① **Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 16 du 17-4-1981.**

⑦① **Déposant : KAYAKU ANTIBIOTIC RESEARCH CO., LTD, société de droit japonais, résidant au Japon.**

⑦② **Invention de : Yoshio Koide, Kiyoto Edo et Nakao Ishida.**

⑦③ **Titulaire : Idem ⑦①**

⑦④ **Mandataire : Cabinet Malémont,
42, av. du Président-Wilson, 75116 Paris.**

La présente invention concerne le nouvel antibiotique
5 antitumoral NCS-C et un procédé pour le préparer.

On sait déjà que la néocarzinostatine, antibiotique anti-
tumoral à haut poids moléculaire (voir la publication de bre-
vet japonais N° 21752/1967 publiée le 26 octobre 1967),
fraction N-1, fraction N-2 (voir la publication de brevet
10 japonais N° 680/1972 publiée le 10 Janvier 1972) et frac-
tion Ma (voir la publication de brevet japonais N° 13516/1979
publiée le 31 Mai 1979) sont obtenus en cultivant le variant
F41 Kuroya de streptomyces carzinostaticus. Les auteurs de la
présente invention ont poursuivi les recherches sur la substan-
15 ce cultivée et ont découvert qu'elle contenait également un
nouvel antibiotique antitumoral NCS-C qui diffère par ses
propriétés physiques et chimiques de la néocarzinostatine,
de sa fraction N-1, de sa fraction N-2 et de sa fraction Ma.

En conséquence, un objectif premier de la présente invention
20 est de procurer le nouvel antibiotique antitumoral NCS-C
(ci-après appelé substance NCS-C) ainsi que ses sels d'acide
libres.

Un autre objectif de la présente invention est de procurer
un nouveau procédé de préparation du nouvel antibiotique
25 antitumoral NCS-C et de ses sels d'acide libres.

Selon un des aspects de l'invention, il est procuré l'anti-
biotique antitumoral NCS-C. Son sel d'acide chlorhydrique a
les propriétés physiques et chimiques suivantes :

- (a) apparence : poudre jaunâtre claire brunâtre
- 30 (b) point de décomposition : 125°C
- (c) rotation spécifique : $[\alpha]_D^{20} = -171^\circ$
($c = 1,4 \times 10^{-3}$, dans le méthanol)
- (d) analyse élémentaire : C 51,72, H 4,94, N 2,03, O 31,00
Cl 10,31
- 35 (e) poids moléculaire : 686,5 à 688,5
- (f) formule brute : $C_{30}H_{33-35}Cl_2NO_{13}$
- (g) spectre d'absorption ultraviolet : épaulements à 240, 274
290, 305 et 330 nm

(h) spectre d'absorption infrarouge : absorptions à 3400, 1780, 1610, 1400, 1190, 1080 et 1010 cm^{-1}

5 (i) réactions colorées : réaction au permanganate et réaction de copulation diazoïque positives ; réaction xanthoprotéique, réaction d'Ehrlich, réaction à la Ninhydrine, réaction à l'orcinol, réaction de
10 Molisch négatives.

(j) solubilité : très soluble dans le méthanol, l'éthanol, le propanol et le butanol ; soluble dans l'acétone ; et peu soluble dans l'acétate d'éthyle ; difficilement soluble dans l'eau,
15 l'éther et le benzène.

La présente invention a également pour objet les sels d'acide libres de l'antibiotique antitumoral NCS-C. Selon un autre aspect de la présente invention, il est procuré un procédé de préparation de la substance NCS-C ou de son sel d'acide
20 libre. Le procédé consiste à cultiver un micro-organisme générateur de NCS-C appartenant à la famille des streptomyces dans un milieu de culture, à séparer le milieu de culture en corps bactériens et filtrat de culture ; et à extraire le filtrat de culture à l'aide d'un solvant organique polaire
25 non miscible à l'eau, dans des conditions acides.

Selon encore un autre aspect de la présente invention, il est également procuré un procédé de préparation de la substance NCS-C ou de son sel d'acide libre. Le procédé consiste à décomposer la néocarzinostatine dans des conditions acides de
30 façon à former un sel d'acide libre de la substance NCS-C, et à extraire ledit sel à l'aide d'un solvant organique polaire.

Sur les planches de dessins annexées :

la figure 1 est le spectre d'absorption ultraviolet de
35 l'antibiotique antitumoral NCS-C selon l'invention ; et

la figure 2 est le spectre d'absorption infrarouge de la même substance.

On peut préparer la substance NCS-C selon cette invention, par exemple, de la manière suivante :

On emploie un micro-organisme générateur de néocarzinostatine, qui appartient à la famille des streptomyces, pour préparer la substance NCS-C selon cette invention. Parmi ces
5 micro-organismes, générateurs de néocarzinostatine, il y a le variant F41 Kuroya de streptomyces carzinostaticus et ses mutants, ainsi que toutes les bactéries qui produisent la substance NCS-C et appartiennent à la famille des streptomyces. Le variant F41 Kuroya de streptomyces carzinostaticus a
10 déjà été déposé sous le numéro 2257 à l'institut de recherche sur les fermentations de l'Agence pour la Science et la Technologie Industrielles du Japon, et aussi sous le numéro ATCC 15945 dans la American Type Culture Collection.

Les procédés de culture qui sont décrits dans les publications de brevets japonais susmentionnées N° 21752 /1967 et
15 13516 /1979 peuvent être suivis pour cultiver le variant F41 Kuroya de streptomyces carzinostaticus pour préparer la substance NCS-C selon cette invention.

On peut recueillir la substance NCS-C de la solution de
20 culture conformément à un procédé qui va être décrit ci-dessous. Avant tout, après séparation de la solution de culture en corps bactériens et solution de culture conformément à un procédé connu tel que la séparation par filtration ou par centrifugation, la substance NCS-C se trouve principalement dans
25 le filtrat de la solution de culture. On ajuste ensuite entre 1 et 4 le pH du filtrat ainsi obtenu, à l'aide d'un acide minéral tel que l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique, ou bien à l'aide d'un acide organique tel que l'acide acétique ou l'acide formique. En extrayant le filtrat dont le pH est
30 ainsi ajusté, à l'aide d'un solvant non miscible à l'eau tel que le butanol ou le chloroforme, on fait passer la plus grande partie de la substance NCS-C dans la couche organique. On concentre ensuite la couche organique et on lui fait subir une purification qui comprend soit une chromatographie par
35 adsorption, par exemple sur gel de silice, alumine, ou "Amberlite XAD", soit à une chromatographie en phase inversée, par exemple sur "μ - bondapack C₁₈" ou "Lichrosorb RP-8", soit à une chromatographie de perméation (diffusion) de gel, par exemple sur "Sephadex LH-20" ou gel de "TSK". On obtient ainsi la

substance NCS-C.

On peut également obtenir la substance NCS-C en décomposant, dans des conditions douces, de la néocarzinostatine purifiée. En d'autres termes, quand on met en suspension de la poudre de néocarzinostatine et qu'on l'agite dans des conditions acides dans un solvant organique polaire tel que le méthanol, l'éthanol, le propanol, le butanol, l'acétone ou le chloroforme, elle se décompose en la substance NCS-C, qui se dissout dans le solvant organique, et en prénéocarzinostatine insoluble (décrite dans "Journal of Antibiotics", Vol 27, page 766). On purifie ensuite la substance NCS-C contenue dans le solvant organique, conformément au procédé décrit ci-dessus.

On obtient ainsi la substance NCS-C sous la forme d'un sel d'acide, que l'on peut transformer en la substance NCS-C elle-même conformément à n'importe quel procédé approprié connu en soi dans la technique, par exemple en faisant subir audit sel d'acide une réaction d'hydrolyse. Le sel d'acide chlorhydrique de la substance NCS-C a les caractéristiques suivantes :

20 (1) Propriétés physiques et chimiques :

(a) apparence : poudre jaunâtre clair - brunâtre

(b) point de décomposition : 125 °C

(c) rotation spécifique : $[\alpha]_D^{20} = -171^\circ$
($c = 1,4 \times 10^{-3}$, dans le méthanol)

25 (d) analyse élémentaire : C 51,72, H 4,94, N 2,03, O 31,00,
Cl 10,31.

(e) poids moléculaire : 686,5 - 688,5

(f) formule brute : $C_{30}H_{33-35}Cl_2NO_{13}$

(g) spectre d'absorption ultraviolet (Fig.1):

30 épaulements à 240, 265, 274, 290, 305 et 330 nm

(h) spectre d'absorption infrarouge (Fig.2) :

absorptions à 3400, 1780, 1610, 1400, 1190, 1080
et 1010 cm^{-1}

(i) réactions colorées :

35 réaction au permanganate, et réaction de copulation diazoïque positives;
réaction xanthoprotéique, réaction d'Ehrlich,
réaction à la Ninhydrine, réaction à l'orcinol,
réaction de Molisch négatives

5

(j) solubilité :

très soluble dans le méthanol, l'éthanol, le
propanol et le butanol ;
5 peu soluble dans l'acétate d'éthyle ;
difficilement soluble dans l'eau, l'éther et le
benzène.

(k) stabilité :

stabilité thermique à 60 °C

10

	0 mn	10 mn	30 mn	60 mn
Reliquat (%)	100	84,4	72,4	56,9

15

stabilité aux rayons ultraviolets : irradiation
avec une lampe de stérilisation Toshiba placée
à 20 cm

	0 mn	10 mn	30 mn	60 mn
Reliquat (%)	100	56,9	22,7	7,2

20

pH : après écoulement de quatre heures

	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
Reliquat (%)	100	100	55,1	18,9	0,0

25

(2) Toxicité aigue :

Souris : injection intraveineuse $DL_{50} = 1,8$ mg/kg

Souris : injection intrapéritonéale $DL_{50} = 10$ mg/kg et plus.

(3) Propriétés biologiques :

30 (i) effets antitumoraux :

Sarcome de Yoshida (ip - ip)

35

	Dose maximale tolérée (mg/kg)	Dose minimale efficace (mg/kg)
Substance NCS-C	> 10	0,1
Mélange 1/10 de substance NCS-C et de préneocarzinostatine	0,5	0,005
Préneocarzinostatine	> 10	> 10

Cellules Hela S3

La substance NCS-C n'a pas manifesté ses propriétés anti-tumorales à une concentration de 1,0 mg/ml mais un mélange 10/1 de prénéocarzinostatine et de substance NCS-C a présenté des effets antitumoraux à une concentration de 0,1 mg/ml.

(ii) effets antimicrobiens :

10	Micro-organismes d'essais	Concentration minimale inhibitrice (mcg/ml)		
		Substance NCS-C	Substance NCS-C contenant 10 γ/ml de prénéo- carzino- statine	Prénéo- carzino- statine
15	Proteus vulgaris OX-19	> 100	> 100	> 100
	Proteus morgani IFO 3848	100	100	> 100
	Proteus rettgeri	> 100	> 100	> 100
20	Salmonella typhi V 1901	> 100	> 100	> 100
	Shigella flexneri 2a	100	100	> 100
	Shigella sonnei	> 100	> 100	> 100
25	Escherichia coli NIHJ	> 100	> 100	> 100
	Pseudomonas aeruginosa GN 83	> 100	> 100	> 100
	Serratia marcescens IFO 1022	> 100	> 100	> 100
30	Staphylococcus aureus FDA 209p	50	1,56	> 100
	Staphylococcus epidermidis IFO 3726	25,0	0,4	> 100
	Streptococcus haemolyticus	25,0	< 0,1	> 100
	Sarcina lutea ATCC 9341	12,5	< 0,1	> 100
35	Bacillus subtilis PCI 219	25,0	0,8	> 100
	Bacillus cereus IFO 3001	100	0,8	> 100
	Xanthomonas oryzae IAM 1657	> 100	> 100	> 100
	Candida albicans YU 1200	> 100	> 100	> 100

Comme le montrent les tableaux ci-dessus, bien que la substance NCS-C selon cette invention ait par elle-même des effets antitumoraux et antimicrobiens, on augmente considérablement son efficacité en l'utilisant en association avec la prénéocarzinostatine.

Comme décrit ci-dessus, les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la substance NCS-C selon la présente invention sont entièrement différentes de celles de la néocarzinostatine produite par le variant F41 Kuroya de streptomyces carzinostaticus, de la fraction N-1, de la fraction N-2, de la fraction Ma et du complexe de carzinostatine produit par une espèce bactérienne analogue, streptomyces carzinostaticus (voir la publication de brevets japonais N° 5400 / 1960), ainsi que de tout autre antibiotique antitumoral. Par conséquent, la substance NCS-C selon cette invention a été identifiée comme étant une substance nouvelle.

On va maintenant décrire la présente invention au moyen des exemples suivants :

Exemple 1

Dans un réservoir de culture de 400 l, on a préparé 200 l d'un milieu de culture (ajusté à pH 6,6) composé de 2,0 % d'amidon, 2,0% de farine de soja, 0,5% de levure sèche, 0,25% de chlorure de sodium, 0,35% de carbonate de calcium, 0,005% de chlorure de manganèse, 0,005% de sulfate de cuivre et 0,005% de sulfate de zinc. On a stérilisé thermiquement le milieu de culture à 120 °C pendant 30 minutes. Puis on a chargé dans le réservoir de culture 3 l d'une solution d'ensemencement de variant F41 Kuroya de streptomyces carzinostaticus que l'on avait au préalable cultivé pendant 24 heures sur un milieu de culture ayant une composition identique à celle du milieu de culture ci-dessus. On a ensuite fait subir au milieu de culture une culture de 50 heures à 27 °C dans des conditions d'aération et d'agitation (Alimentation d'air : 300 l/mn, vitesse d'agitation : 180 tours/mn). On a obtenu cent quatre vingt litres (180 l) d'une solution de culture. On a ensuite filtré cette solution de culture au moyen d'un filtre presse. Après avoir ajusté le pH du filtrat à pH 2,0

à l'aide d'acide chlorhydrique, on a ajouté 100 ml de n-butanol, et on a agité la solution résultante pendant 2 heures à une vitesse d'agitation de 180 tours/minute, puis on
5 l'a laissé reposer pendant 24 heures. On a ensuite enlevé la couche butanolique, qui s'était suffisamment séparée de la couche aqueuse et on l'a condensée dans un évaporateur "éclair" à 50 °C. On a obtenu une solution concentrée de la substance NCS-C (rendement : 1200 ml).

10 Exemple 2

On a adsorbé la solution concentrée à l'exemple 1 dans une colonne garnie de 5 litres de gel de silice que l'on avait au préalable équilibré avec du chloroforme. On a ensuite élué la colonne avec un mélange 1/1 de méthanol et de chloro-
15 forme, ce qui a donné 400 ml d'une fraction active. On a ensuite fait subir à cette fraction une concentration et un séchage sous pression réduite. On a obtenu la substance NCS-C sous la forme d'une poudre brute (rendement 2,1 g).

Exemple 3

20 Dans 50 ml de méthanol on a dissout 2,1 g de la poudre brute obtenue à l'exemple 2. On a ensuite fait passer la solution résultante dans une colonne garnie de 1l de "Sephadex LH-20" que l'on avait équilibré au préalable avec un mélange 1/9 d'acide chlorhydrique 1,0 N et de méthanol. On lui a ensuite
25 fait subir une chromatographie en utilisant comme éluant un mélange 1/9 d'acide chlorhydrique 1,0 N et de méthanol. On a recueilli quatre vingt dix millilitres (90 ml) d'une fraction active. On l'a ensuite concentrée et séchée pour obtenir 126 mg de la poudre de substance NCS-C.

30 Exemple 4

Dans 1,5 litre d'une solution de méthanol à 95% on a mis en suspension 16 g de poudre de néocarzinostatine. Après avoir ajusté à 2,0 le pH de la suspension à l'aide d'acide chlorhy-
drique 1 N, on a agité la suspension pendant deux heures, puis
35 on lui a fait subir une séparation centrifuge. On a ensuite concentré le liquide surnageant et on l'a séché pour obtenir 920 mg de poudre brute de la substance NCS-C. On a fait subir à cette poudre brute une chromatographie sur "Sephadex LH-20"

de la même manière que dans l'exemple 3. On a obtenu la substance NCS-C sous la forme d'une poudre (rendement 105 mg).

REVENDICATIONS

1. Antibiotique antitumoral NCS-C et ses sels d'acides libre, le sel d'acide chlorhydrique ayant les propriétés physiques et chimiques suivantes :
- (a) apparence : poudre jaunâtre clair - brunâtre
 - (b) point de décomposition : 125 °C
 - (c) rotation spécifique : $[\alpha]_D^{20} = -171^\circ$
(c) = $1,4 \times 10^{-3}$, dans le méthanol
 - 10 (d) analyse élémentaire : C 51,72, H 4,94, N 2,03, O 31,00, Cl 10,31.
 - (e) poids moléculaire : 686,5 - 688,5
 - (f) formule brute : $C_{30}H_{33-35}Cl_2NO_{13}$
 - (g) spectre d'absorption ultraviolet : épaulements à 240, 265, 15 274, 290, 305 et 330nm
 - (h) spectre d'absorption infrarouge : absorptions à 3400, 1780, 1610, 1400, 1190, 1080 et 1010 cm^{-1}
 - (i) réactions colorées :
 - 20 réaction au permanganate et réaction de copulation diazoïque positives ; réaction xanthoprotéique, réaction d'Ehrlich, réaction à la Ninhydrine, réaction à l'orcinol, et réaction de Molisch négatives
 - 25 (j) solubilité :
très soluble dans le méthanol, l'éthanol, le propanol et le butanol ;
soluble dans l'acétone,
peu soluble dans l'acétate d'éthyle ;
 - 30 difficilement soluble dans l'eau, l'éther et le benzène .
2. Procédé de préparation de l'antibiotique antitumoral NCS-C et de ses sels d'acides libre , le sel d'acide chlorhydrique ayant les caractéristiques physiques et chimiques suivantes :
- (a) apparence : poudre jaunâtre clair - brunâtre
 - (b) point de décomposition : 125 °C

- 11
- (c) rotation spécifique : $[\alpha]_D^{20} = -171^\circ$
 (c = $1,4 \times 10^{-3}$, dans le méthanol)
- (d) analyse élémentaire : C 51,72, H 4,94, N 2,03, O 31,00,
 5 Cl 10,31
- (e) poids moléculaire : 686,5 - 688,5
- (f) formule brute : $C_{30}H_{33-35}Cl_2NO_{13}$
- (g) spectre d'absorption ultraviolet : épaulements à 240, 265
 274, 290, 305 et 330 nm
- 10 (h) spectre d'absorption infrarouge : absorptions à 3400,
 1780, 1610, 1400, 1190, 1080 et
 1010 cm^{-1}
- (i) réactions colorées :
 réaction au permanganate et réaction de copulation
 15 diazoïque positives : réaction xanthoprotéique,
 réaction d'Ehrlich, réaction à la Ninhydrine,
 réaction à l'orcinol, et réaction de Molisch
 négatives
- (j) solubilité :
 20 très soluble dans le méthanol, l'éthanol, le propanol
 et le butanol ;
 soluble dans l'acétone ;
 peu soluble dans l'acétate d'éthyle ;
 difficilement soluble dans l'eau, l'éther et
 25 le benzène,
- caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver un micro-
 organisme générateur de NCS-C appartenant à la famille des
 streptomyces, dans un milieu de culture ; à séparer ce milieu
 de culture en corps bactériens et filtrat de culture ; et à
 30 extraire le filtrat de culture à l'aide d'un solvant organi-
 que polaire non miscibles à l'eau, dans des conditions acides.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que
 ledit micro-organisme générateur de NCS-C est choisi dans le
 groupe comprenant le variant F41 Kuroya de streptomyces
 35 carzinostaticus et ses mutants.
4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en
 ce que l'on ajuste le pH dudit filtrat de culture entre 1 et 4
 avant de l'extraire.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que ledit solvant organique polaire, non miscible à l'eau est le butanol ou le chloroforme.

- 5 6. Procédé de préparation de l'antibiotique antitumoral NCS-C et de ses sels d'acides libre, le sel d'acide chlorhydrique ayant les caractéristiques physiques et chimiques suivantes :

(a) apparence : poudre jaunâtre clair - brunâtre

10 (b) point de décomposition : 125 °C

(c) rotation spécifique : $[\alpha]_D^{20} = -171^\circ$
(c = $1,4 \times 10^{-3}$, dans le méthanol)

(d) analyse élémentaire : C 51,72, H 4,94, N 2,03, O 31,00;
Cl 10,31

15 (e) poids moléculaire : 686,5 - 688,5

(f) formule brute : $C_{30}H_{33-35}ClNO_{13}$

(g) spectre d'absorption ultraviolet : épaulements à 240, 265,
274, 290, 305 et 330 nm

(h) spectre d'absorption infrarouge : absorptions à 3400,
20 1780, 1610, 1400, 1190, 1080 et
1010 cm^{-1}

(i) réactions colorées :

réaction au permanganate et réaction de copulation
diazotique positives ; réaction xanthoprotéique,
25 réaction d'Ehrlich, réaction à la Ninhydrine,
réaction à l'orcinol et réaction de Molish
négatives

(j) solubilité :

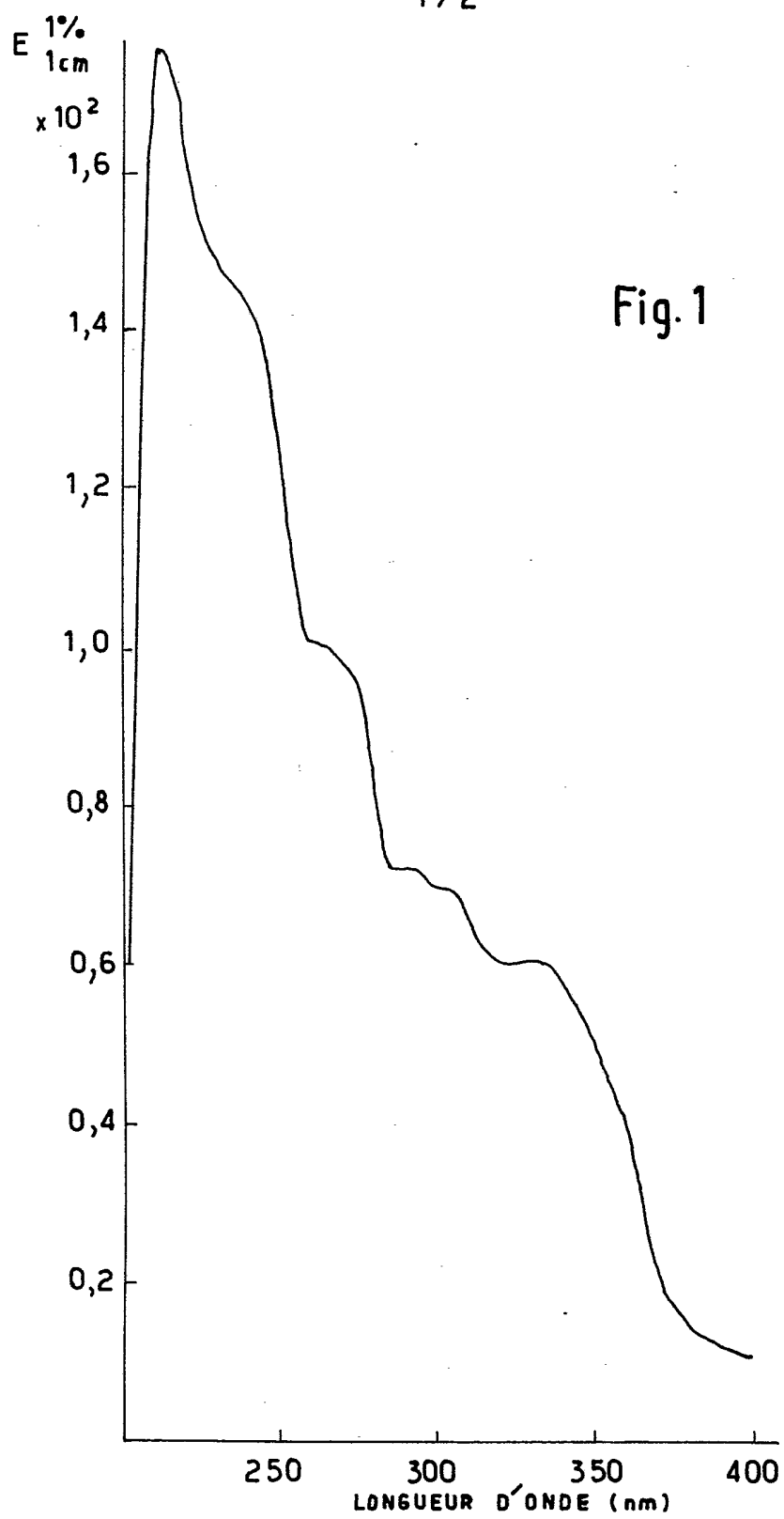
très soluble dans le méthanol, l'éthanol, le propa-
30 nol et le butanol ;
soluble dans l'acétone ;
peu soluble dans l'acétate d'éthyle,
difficilement soluble dans l'eau, l'éther et le
benzène ,

35 caractérisé en ce qu'il consiste à décomposer la
néocarzinostatine dans des conditions acides de façon à former
un sel d'acide libre de l'antibiotique de l'antitumoral NCS-C,
et à extraire ledit sel à l'aide d'un solvant organique polaire.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on procède simultanément à ladite décomposition et à ladite extraction en mettant la néocarzinostatine en suspension, dans les conditions acides, dans le solvant organique polaire, et en laissant le sel d'acide libre migrer dans le solvant organique.

8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que ledit solvant organique polaire est le méthanol, l'éthanol, le propanol, le butanol, l'acétone ou le chloroforme.

1/2



2 / 2

