



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

 (51) Int. Cl.³: C 07 C 103/52
 A 61 K 39/39
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)

643 816

(21) Numéro de la demande: 9378/79

(22) Date de dépôt: 18.10.1979

 (30) Priorité(s): 19.10.1978 FR 78 29838
 05.10.1979 FR 79 24923

(24) Brevet délivré le: 29.06.1984

 (45) Fascicule du brevet
 publié le: 29.06.1984

 (73) Titulaire(s):
 ANVAR-Agence Nationale de Valorisation de la
 Recherche, Neuilly-sur-Seine (FR)

 (72) Inventeur(s):
 Pierre Jolles, Paris (FR)
 Jean Florent, Boulogne-Billancourt (FR)
 Jean Lunel, Paris (FR)
 Denise Mancy, Charenton (FR)
 Danièle Migliore-Samour, Kremlin-Bicêtre (FR)

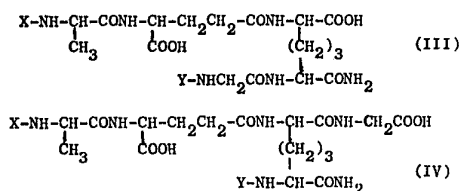
 (74) Mandataire:
 Kirker & Cie SA, Genève

(54) Composés hydrosolubles provenant d'extrait de Streptomyces stimulosus, leur obtention, leur application à titre d'adjuvants immunologiques et compositions les contenant.

(57) Nouveaux composés hydrosolubles et leurs applications.

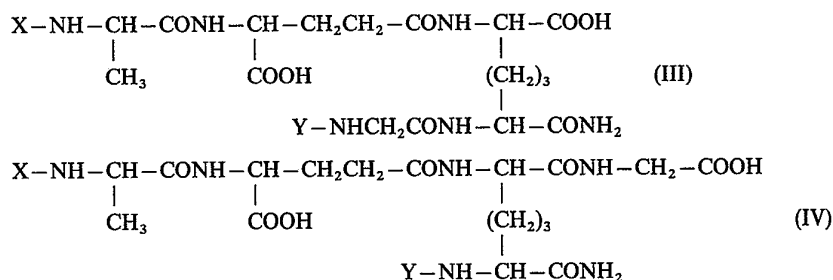
Ils consistent en des composés de formules (III) et (IV) ci-après ou leur mélange en proportion molaire voisine de 4/1 environ dans lesquelles X représente un radical RCO et Y représente un atome d'hydrogène ou un radical RCO, ou bien dans lesquelles Y représente un radical RCO et X représente un atome d'hydrogène ou un radical RCO, R étant un radical alcoyle ou alcényle contenant 11 à 19 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée.

Applications: adjuvants immunologiques.



REVENDICATIONS

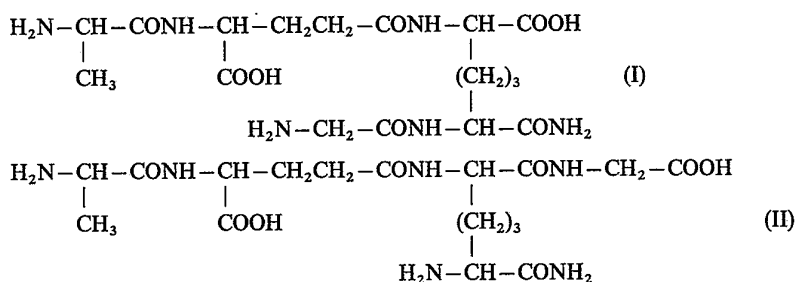
1. Composé hydrosoluble choisi parmi les composés répondant aux formules générales (III) et (IV) suivantes et leur mélange en proportion molaire voisine de 4/1:



dans lesquelles X représente un radical RCO et Y représente un atome d'hydrogène ou un radical RCO, ou bien dans lesquelles Y représente un radical RCO et X représente un atome d'hydrogène ou un radical RCO, étant entendu que, dans ces définitions, R représente un radical alcoyle ou alcényle contenant 11 à 19 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée et dans lesquelles les acides aminés ont les configurations suivantes: Ala:L, Glu:D et Dap:LL.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le radical RCO est le radical lauroyle.

3. Procédé pour l'obtention de composés selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un dérivé d'un acide de formule RCOOH, dans laquelle R est tel que défini dans la revendication 1, avec un produit choisi parmi les produits répondant aux formules (I) et (II) suivantes:



et leur mélange dans un rapport molaire de 4/1 environ, les acides aminés ayant les configurations spécifiées dans la revendication 1.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le dérivé d'acide aliphatique est l'anhydride.

5. Procédé selon la revendication 4, pour la préparation du composé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on utilise l'anhydride laurique.

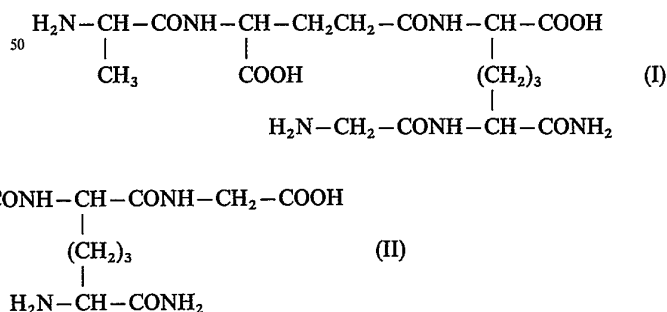
6. Application du procédé selon la revendication 3 à des produits (I) et (II) obtenus à partir d'un extrait hydrosoluble de *Streptomyces stimulosus*.

7. Compositions pharmaceutiques utilisables en thérapeutique humaine ou vétérinaire, caractérisées en ce qu'elles contiennent, à titre d'adjuvant immunologique, au moins l'un des composés selon l'une des revendications 1 ou 2.

La présente invention concerne de nouveaux composés possédant une utilité à titre d'adjuvants immunologiques, plus particulièrement des composés provenant d'extrait hydrosoluble de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 (NRRL 5776), leur procédé de préparation et les compositions qui les contiennent.

Plus précisément, les nouveaux composés selon l'invention proviennent du couplage avec des acides aliphatiques à longue chaîne

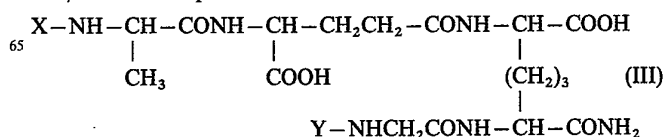
des produits répondant aux formules (I) et (II) ci-après, soit seuls soit en mélange dans un rapport molaire de 4/1 environ:

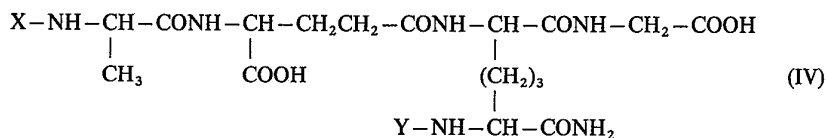


où les acides aminés ont les configurations suivantes: Ala:L, Glu:D et Dap:LL.

Les composés selon la présente invention sont donc constitués d'extrait hydrosoluble de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 (NRRL 5776), couplé avec les acides aliphatiques à longue chaîne, lesdits composés répondant aux formules générales (III) et (IV) sui-

vantes, ou consistant en un mélange dans un rapport molaire voisin de 4/1 desdits composés:





dans lesquelles X représente un radical RC et Y représente un atome d'hydrogène ou un radical RCO, ou bien dans lesquelles Y représente un radical RCO et X représente un atome d'hydrogène ou un radical RCO, étant entendu que, dans ces définitions, R représente un radical alkyle ou alcényle contenant 11 à 19 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée et dans lesquelles les acides aminés ont les configurations indiquées précédemment. Ces composés sont eux-mêmes pratiquement hydrosolubles.

Dans la présente description, on désignera par composés de l'invention les composés répondant aux formules générales (III) et (IV) précitées, considérés isolément ou dans un mélange en proportion molaire respective de 4/1 environ.

De la même manière, on désignera par produits de départ les produits répondant aux formules générales (I) et (II) précitées, considérés isolément ou dans un mélange en proportion molaire respective de 4/1 environ.

Selon l'invention, les composés revendiqués peuvent être obtenus par action d'un dérivé activé d'un acide aliphatique de formule générale:



dans laquelle R est défini comme précédemment (par exemple l'acide laurique), sur l'un des produits (tétrapeptides) de formule (I) ou (II) ou leur mélange. Il est particulièrement avantageux d'utiliser comme dérivé activé de l'acide (V) son anhydride, dans un rapport peptide/anhydride voisin de 1/5. Dans ce cas, on opère dans un solvant organique miscible à l'eau, tel que l'alcool butylique tertiaire, à une température comprise entre 15 et 35°C, de préférence à une température voisine de 20°C, en présence d'une base telle que le carbonate de sodium en solution aqueuse.

Les composés selon l'invention sont ensuite isolés du milieu réactionnel par exemple par précipitation, évaporation des solvants ou tous autres moyens appropriés.

Les nouveaux composés de la présente invention peuvent être éventuellement purifiés par des méthodes physiques couramment utilisées pour une purification, telles que précipitation, dialyse, chromatographie, filtrations sur divers supports utilisés à cet effet.

Les produits de départ peuvent être obtenus par purifications successives d'un extrait, désigné sous le numéro 34129 R.P., de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 (NRRL 5776), au moyen de la chromatographie sur divers supports utilisés à cet effet. On opère généralement dans un solvant aqueux très légèrement acide, par exemple l'acide acétique en solution 0,01N. En opérant des chromatographies successives sur des supports tels que les Biogels, on obtient en général le mélange des produits (I) et (II) dans un rapport molaire voisin de 4/1 environ. On peut séparer les tétrapeptides de formules (I) et (II) par des moyens connus, par exemple en soumettant le mélange à une chromatographie sur une colonne Dowex 50 x 4 et en éluant avec des mélanges de solvants convenables dont l'acidité va en décroissant. Comme solvant d'élution, il est particulièrement intéressant d'utiliser un mélange pyridine/acide acétique/eau dont le pH est ajusté à la valeur désirée par addition d'acide formique. Ainsi, dans un tel système, le tétrapeptide de formule (I) est élué lorsque le pH atteint 4,1.

Chacun des tétrapeptides ainsi obtenu est désalifié par filtration sur une colonne de Biogel P₂ en éluant avec de l'acide acétique 0,01M.

Les structures des produits de départ ont été déterminées grâce à l'étude de dipeptides obtenus par hydrolyse acide partielle ainsi que par spectrométrie de masse. Les deux acides N-terminaux, Ala et Gly, ont été mis en évidence au moyen des méthodes classiques d'Edman et de dansylation. L'absence de sucres réducteurs aminés ou non aminés a été vérifiée par chromatographie en phase gazeuse.

L'extrait de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 (NRRL 5776), désigné sous le numéro 34129 R.P., présente les caractéristiques essentielles suivantes:

Aspect: poudre crème, amorphe (après lyophilisation).

Composition:

a) en acides aminés: alanine (5 à 7%), acide glutamique (7 à 10%), glycine (2,5 à 4%), acide α,α-diaminopimélique (5 à 8%);
b) en sucres aminés: N-acétylglucosamine (5 à 10%), acide muramique (5 à 10%).

Analyse élémentaire:

C 40,4-41,4 H 6,7-6,9 N 8,0-10,6%

Spectre infrarouge: détermination à partir de comprimés en mélange avec KBr.

Ce spectre est représenté par la fig. 3 annexée, sur laquelle on a porté en abscisses, d'une part, les longueurs d'onde exprimées en microns (échelle supérieure) et, d'autre part, les nombres d'onde en cm⁻¹ (échelle inférieure), et en ordonnées les densités optiques.

Dans le tableau I sont indiquées les principales bandes d'absorption infrarouge de l'extrait 34129 R.P., exprimées en nombres d'onde (cm⁻¹).

Tableau I

3400 H ₂ O	1320 f
3300 ép.	1260 m
3100 ép.	1140 ép.
2970 m	1115 m
2950 m	1075 ép.
2880 ép.	1040 F
2600 ép.	975 ép.
2060 tf.	910 f
1650 tF	855 ép.
1590 tF	770 ép.
1450 m	720 ép.
1400 F	690 ép.

tF = très forte, tf. = très faible, m = moyenne, F = forte, f = faible, ép. = épaulement.

Le procédé de préparation de l'extrait hydrosoluble 34129 R.P. consiste à soumettre à des autolyses répétées des cellules de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 délipidées, puis à fractionner la partie soluble dans l'eau par filtration à travers des supports de porosité convenable.

Le micro-organisme *Streptomyces stimulosus* DS 25556 a été isolé à partir d'un échantillon de terre prélevé en Inde. L'isolement a été effectué en suivant la méthode générale qui consiste à mettre une petite quantité de terre en suspension dans l'eau à différentes concentrations, et à étaler un petit volume de chaque dilution sur la surface de boîtes de Petri contenant un milieu nutritif gélosé. Après une incubation de quelques jours à 26°C, qui permet au micro-organisme de se développer, les colonies que l'on veut isoler pour en poursuivre l'étude sont prélevées et repiquées sur des géloses nutritives afin d'en obtenir des cultures plus abondantes.

Un échantillon de cette souche a été déposée au Northern Regional Research Laboratory de l'U.S. Department of Agriculture à Peoria, Illinois (Etats-Unis) où il a été enregistré sous la référence NRRL 5776. Ce laboratoire est autorisé irrévocablement à distribuer cette souche à toute personne ayant légalement connaissance du présent document.

Streptomyces stimulosus DS 25556 forme des spores cylindriques mesurant 0,6 à 0,8 μ/1,0 à 1,3 μ. Les chaînes sporifères, droites ou légèrement flexueuses, sont en général longues et comportent le plus

souvent plusieurs dizaines de spores; les sporophores sont simples ou présentent quelques ramifications en grappes. Par son mode de sporulation, cette souche se classe dans la section *Rectus-flexibilis* de la classification de Pridham.

Streptomyces stimulosus DS 25556 présente un mycélium aérien sporulé de couleur grise. Il se développe bien à 26°C, mal à 37°C et pas du tout à 50°C.

Il donne une production abondante de pigment mélanique noir sur les milieux organiques, et en particulier sur la gélose spéciale tyrosine/extrait de levure de Waksman (Melanin formation medium; voir Réf. F citée ci-après); en outre, dans certains cas, il produit également, d'une manière plus ou moins abondante, un pigment soluble allant de violet-bleu à rouge suivant le degré d'acidité du milieu auquel il est susceptible de communiquer sa teinte. Ce dernier pigment est produit particulièrement abondamment sur la gélose au malate de calcium, qui prend une teinte violet-bleu intense très caractéristique.

Dans ses cultures effectuées à 26°C, il présente les caractères biochimiques suivants:

- production de mélanine: positive;
- production de H₂S: positive;
- tyrosinase: positive;
- liquéfaction de la gélatine: positive;
- utilisation de la cellulose: positive;
- production de nitrites à partir des nitrates: positive sur milieux synthétiques aussi bien que sur bouillon nutritif nitraté;
- hydrolyse de l'amidon: positive;
- culture sur lait: peptonisation sans coagulation, avec alcalinisation du pH qui passe de 6,3 à 7,8 en un mois.

Les caractères cultureux de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 sont rassemblés dans le tableau ci-dessous. Ce sont ceux de cultures arrivées à un bon stade de développement, c'est-à-dire d'environ 2 à 3 semaines à 26°C, sauf indications contraires. Ces caractères ont été observés sur des géloses nutritives et des bouillons habituellement utilisés pour déterminer les caractères morphologiques des souches de *Streptomyces*, les cultures sur milieux gélosés étant effectuées sur des géloses inclinées. Un certain nombre des milieux de culture employés ont été préparés d'après les formules indiquées dans «The Actinomycetes», S.A. Waksman, pp. 193-197, in «Chronica Botanica Company», Waltham, Mass., U.S.A., 1950; dans ce cas, ils sont indiqués par la lettre W suivie du numéro qui leur a été attribué

dans «The Actinomycetes». Les références ou constitutions des autres milieux de culture sont les suivantes:

- Réf. A: «Hickey and Tresner's Agar», T.G. Pridham et coll., «Antibiotics Annual», 1956-1957, p. 950.
- 5 Réf. B: «Bennett's Agar», S.A. Waksman, «The Actinomycetes», vol. 2, p. 331, N° 30, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961.
- Réf. C: Formule W, 23, additionnée de 2% de gélose.
- Réf. D: «Yeast Extract Agar», T.G. Pridham *et al.*, «Antibiotics
- 10 Annual», 1956-1957, p. 950.
- Réf. E: «Tomato paste Oatmeal Agar», T.G. Pridham et coll., «Antibiotics Annual», 1956-1957, p. 950.
- Réf. F: «Melanin formation medium», S.A. Waksman, «The Actinomycetes», vol. 2, p. 333, N° 42, The Williams and Wilkins
- 15 Company, Baltimore, 1961.
- Réf. G: W.E. Grundy et coll., «Antibiotics and Chem.», 2, 401, 1952.
- Réf. H: «Inorganic Salts, Starch Agar», T.G. Pridham *et al.*, «Antibiotics Annual», 1956-1957, p. 951.
- 20 Réf. I: «Medium 1 with a mineral source of nitrogen», G.F. Gauze *et al.*, «Problems in the classification of Antagonistic Actinomycetes», p. 13, The American Institute of Biological Sciences, Washington 6, D.C., 1959.
- Réf. J: correspond à la formule W-1, où 30 g de saccharose sont
- 25 remplacés par 15 g de glucose.
- Réf. K: correspond à la formule W-1, où 30 g de saccharose sont remplacés par 15 g de glycérine.
- Réf. L: «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y., II₅₀-19.
- 30 Réf. M: correspond à la formule W-18, où le saccharose est supprimé et remplacé par de petites bandes de papier-filtre immergées partiellement dans le liquide.
- Réf. N: «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y., II₅₀-18.
- 35 Réf. P: «Plain gelatin», préparé suivant les indications du «Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria», Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y., II₅₀-18.
- Réf. Q: lait écrémé en poudre commercial, reconstitué selon les indications du fabricant.
- 40 Réf. R: milieu indiqué pour la recherche de la production de H₂S par: H.D. Tresner et F. Danga, «Journal of Bacteriology», 76, 239-244, 1958.

Milieux de culture	Degré de développement	Mycélium végétatif ou envers de la culture	Appareil aérien (comprenant l'ensemble du mycélium aérien et de la sporulation)	Pigment soluble	Observations et propriétés biochimiques
Gélose de Hickey et Tresner (Réf. A)	Bon	Envers brun-noir	Gris foncé	Noir, abondant	Spores cylindriques mesurant 0,6 à 0,8 µ/1,0 à 1,3 µ. Chaînes sporifères droites comportant plusieurs dizaines de spores. Sporophores simples ou avec quelques ramifications en grappes
Gélose de Bennett (Réf. B)	Bon	Envers marron foncé	Gris violacé	Brun très foncé	—
Gélose d'Emerson (Réf. C)	Bon	Envers brun-jaune très foncé	Gris	Brun noirâtre	—
Gélose à l'extrait de levure de Pridham (Réf. D)	Bon	Envers brun-jaune foncé à brun-noir	Gris clair violacé à gris foncé	Brun noirâtre	—

Milieux de culture	Degré de développement	Mycélium végétatif ou envers de la culture	Appareil aérien (comprenant l'ensemble du mycélium aérien et de la sporulation)	Pigment soluble	Observations et propriétés biochimiques
Gélose à la farine d'avoine et à l'extrait de tomates de Pridham (Réf. E)	Bon	Envers brun-jaune foncé	Gris foncé	Brun foncé	—
Gélose glucose/peptone (W-7)	Bon	Envers brun noirâtre	Gris foncé	Brun-noir	—
Gélose nutritive (W-5)	Assez bon	Envers brun-jaune	Gris clair	Brun noirâtre	—
Gélose tyrosine/extrait de levure pour formation de mélanine (Réf. F)	Assez bon	Envers brun noirâtre	Gris rosé clair	Noir abondant	Production de mélanine positive (lectures effectuées selon les recommandations de l'auteur)
Gélose au malate de calcium de Krainsky (Réf. G)	Modéré	Envers violet	Gris Modérément développé	Violet-bleu abondant	Solubilisation du malate positive, mais lente
Gélose à l'ovalbumine (W-12)	Pauvre	M.V. incolore à gris orangé Très pauvrement développé	Grisâtre A l'état de traces	Gris orangé faible	—
Gélose glucose/asparagine (W-2)	Modéré	Envers brun orangé	Blanchâtre à gris Très modérément développé	Rose orangé faible	—
Gélose glycérine/asparagine (W-3)	Assez bon	Envers brun orangé	Blanc rosé à gris Modérément développé	Rouge brunâtre	—
Gélose amidon/sels minéraux de Pridham (Réf. H)	Bon	Envers brun-jaune	Gris et jaunâtre	Brun-jaune grisâtre	Hydrolyse de l'amidon: positive. Spores cylindriques mesurant 0,6 à 0,8 μ / 1,0 à 1,3 μ . Chaînes sporifères droites comportant plusieurs dizaines de spores. Sporophores simples ou avec quelques ramifications en grappes
Gélose amidon/nitrate (W-10)	Moyen	Envers brun-jaune à brun noirâtre	Gris clair à gris foncé	Gris-brun	Hydrolyse de l'amidon: positive
Gélose avec source d'azote minérale de Gauze (Réf. I)	Bon	Envers violet foncé	Gris foncé	Violet grisâtre foncé	—
Gélose synthétique de Czapek au saccharose (W-1)	Presque nul	M.V. peu développé	Blanc grisâtre A l'état de traces	Nul	—
Gélose synthétique de Czapek au glucose (Réf. J)	Assez bon	Envers brun-jaune	Blanchâtre à gris Modérément développé	Brun foncé	—
Gélose synthétique de Czapek à la glycérine (Réf. K)	Assez bon	M.V. épais et plissé se fendillant brun orangé assez foncé Envers brun orangé foncé	Blanchâtre à gris Très modérément développé	Brun orangé foncé	—
Bouillon amidon/nitrate (W-19)	Bon	Voile épais Envers brun foncé	Gris foncé	Brun, en petites quantités à partir de la surface	Formation de nitrites: positive

Milieux de culture	Degré de développement	Mycélium végétatif ou envers de la culture	Appareil aérien (comprenant l'ensemble du mycélium aérien et de la sporulation)	Pigment soluble	Observations et propriétés biochimiques
Bouillon glucose/nitrate de Dimmick (Réf. L)	Modéré	Léger voile blanc grisâtre	Nul	Nul	Formation de nitrites: positive
Bouillon de Czapek à la cellulose (Réf. M)	Moyen	Léger voile blanchâtre	Grisâtre clair Très modérément développé	Nul	Formation de nitrites: positive. Utilisation de la cellulose: positive
Bouillon nutritif nitraté Difco (Réf. N)	Moyen	Voile brunâtre	Gris clair à gris foncé Modérément développé	Brun clair	Formation de nitrites: positive
Culture sur pomme de terre (W-27)	Très bon	M.V. épais et plissé brun orangé à brun rougeâtre très foncé, allant vers noirâtre	Blanchâtre à gris Modérément développé	Noir	—
Gélatine pure à 12% (Réf. P)	Bon	M.V. brun-jaune	Blanchâtre à grisâtre A l'état de traces	Brun-jaune	Liquéfaction positive, bonne
Lait écrémé (Réf. Q)	1) à 25°C: bon	Anneau brun-jaune	Blanc grisâtre A l'état de traces	—	Peptonisation sans coagulation, pH passant de 6,3 à 7,8 en un mois
	2) à 37°C: très modéré	Anneau brun foncé mal développé	Nul	—	Peptonisation sans coagulation, pH passant de 6,3 à 8,0 en un mois
Gélose de Tresner et Danga (Réf. R)	Bon	M.V. brun noirâtre	Blanc grisâtre A l'état de traces	Noir	Production de H ₂ S positive (lectures effectuées selon les recommandations des auteurs)

Streptomyces stimulosus DS 25556 présente un ensemble de caractères qui ne coïncident exactement avec aucun de ceux des souches déjà décrites, et c'est pourquoi on doit le considérer comme une espèce nouvelle.

En considérant les espèces dont la description est donnée dans «The Actinomycetes» (vol. 2, S.A. Waksman, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961) ainsi que dans le «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» (7^e éd., the William and Wilkins Company, Baltimore, 1957), les deux espèces dont il se rapprocherait le plus sont deux espèces décrites dans «The Actinomycetes»: *Streptomyces phaeopurpureus* et *Streptomyces purpureofuscus*; comme elles, en effet, *Streptomyces stimulosus* DS 25556 forme des pigments mélaniques sur les milieux organiques, donne sur la plupart des milieux un mycélium végétatif allant de brun-jaune ou brun orangé foncé à brun-noir, et sur pomme de terre développe un mycélium végétatif brun orangé à brun rougeâtre en montrant un mycélium aérien modérément développé allant de blanchâtre à gris. Toutefois, il ne peut être reconnu identique à aucune de ces deux espèces car, d'une part, *Streptomyces phaeopurpureus* forme des spores sphériques à elliptiques, donne une bonne croissance sur gélose synthétique de Czapek au saccharose (saccharose/nitrate/agar), n'utilise pas la cellulose, ne réduit pas les nitrates et utilise le rhamnose, alors que *Streptomyces stimulosus* DS 25556 forme des spores cylindriques, donne une croissance pratiquement inexistante sur gélose synthétique de Czapek au saccharose, utilise la cellulose, réduit fortement les nitrates et n'utilise pas le rhamnose; d'autre

part, *Streptomyces purpureofuscus* donne une bonne croissance sur gélose synthétique de Czapek au saccharose, un mycélium végétatif incolore et un pigment soluble brun rougeâtre à brun vineux foncé sur gélose nutritive, un pigment soluble pourpre sur pomme de terre, un pigment soluble vert jaunâtre sur gélatine, coagule le lait et n'utilise pas la cellulose, alors que *Streptomyces stimulosus* DS 25556 donne une croissance pratiquement inexistante sur gélose synthétique de Czapek au saccharose, un mycélium végétatif brun-jaune et un pigment soluble brun noirâtre sur gélose nutritive, un pigment soluble noir et non pourpre sur pomme de terre, un pigment soluble brun-jaune sans nuance de vert sur gélatine, ne coagule pas le lait et utilise la cellulose.

Si, par ailleurs, on considère les espèces décrites par G.F. Gauze et al. («Problems in the classification of Antagonistic Actinomycetes», The American Institute of Biological Sciences, Washington, 1959), on constate que *Streptomyces stimulosus* DS 25556 se classe dans la série *Violaceus* qui est caractérisée par la formation d'un mycélium aérien gris et d'un mycélium végétatif violet-bleu à brun rougeâtre sur milieu avec source d'azote minérale de Gauze. Dans cette série, les deux souches dont on pourrait le rapprocher par la couleur violette de son mycélium végétatif sur milieu avec source d'azote minérale de Gauze et son mode de sporulation sont *Actinomyces violaceorectus* et *Actinomyces prunicolor*. Toutefois, *Actinomyces violaceorectus* forme sur gélose à l'amidon un mycélium végétatif et un pigment soluble violet, sur pomme de terre un mycélium végétatif et un pigment soluble violet-rouge, et en outre n'utilise pas la cellulose

et ne réduit pas les nitrates, alors que *Streptomyces stimulosus* DS 25556 forme sur gélose à l'amidon un mycélium végétatif brun-jaune à brun noirâtre et un pigment soluble gris-brun, sur pomme de terre un mycélium végétatif brun orangé à brun rougeâtre et un pigment soluble noir, et en outre utilise la cellulose et réduit fortement les nitrates. De son côté, *Actinomyces prunicolor*, contrairement à *Streptomyces stimulosus* DS 25556, n'utilise pas la cellulose, ne réduit pas les nitrates, et enfin forme un pigment violet qui n'est pas soluble dans le milieu gélosé et, par conséquent, ne peut être comparé au pigment soluble violet produit par *Streptomyces stimulosus* DS 25556.

La capacité de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 à utiliser diverses sources de carbone et d'azote pour assurer son développement a été déterminée suivant le principe de la méthode de Pridham et Gottlieb («J. of Bact.», 56, 107-114, 1948); le degré de développement a été observé sur le milieu de base indiqué par les auteurs en remplaçant soit le glucose par les diverses sources de carbone respectivement essayées, soit $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ par les diverses sources d'azote respectivement essayées. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant:

Source de carbone essayée	Utilisation	Sources d'azote essayées	Utilisation
D-ribose	négative	NO_3Na	positive
D-xylose	positive	NO_2Na	positive
L-arabinose	positive	$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	positive
L-rhamnose	négative	$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	positive
D-glucose	positive	adénine	positive
D-galactose	positive	adénosine	positive
D-fructose	négative	uracile	négative
D-mannose	positive	urée	positive
L-sorbose	négative	L-asparagine	positive
lactose	positive	glycocolle	positive
maltose	positive	sarcosine	négative
saccharose	négative	DL-alanine	positive
tréhalose	négative	DL-valine	positive
cellobiose	positive	acide DL-aspartique	positive
raffinose	négative	acide L-glutamique	positive
dextrine	positive	L-arginine	positive
inuline	négative	L-lysine	positive
amidon	positive	DL-sérine	positive
glycogène	positive	DL-thréonine	positive
glycérol	positive	taurine	négative
érythritol	négative	DL-phénylalanine	positive
adonitol	négative	L-tyrosine	positive
dulcitol	négative	DL-proline	positive
D-mannitol	négative	L-hydroxyproline	positive
D-sorbitol	négative	L-histidine	positive
inositol	négative	L-tryptophane	positive
salicine	positive	bétaïne	négative

Le procédé de préparation des cellules de *Streptomyces stimulosus* consiste essentiellement à cultiver *Streptomyces stimulosus* DS 25556 (NRRL 5776) sur un milieu et dans des conditions appropriées et à séparer les cellules qui se sont multipliées au cours de la culture.

La culture de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 peut être effectuée par toute méthode de culture aérobie en surface ou en profondeur, mais cette dernière est à préférer pour des raisons de commodité. On utilise à cette fin les différents types d'appareils qui sont d'un usage courant dans l'industrie des fermentations.

On peut en particulier adopter la marche suivante pour la conduite des opérations:

Streptomyces stimulosus DS 25556—stock

↓
culture sur gélose

↓
culture en fiole agitée

↓
culture inoculum en fermenteur

↓
culture de production en fermenteur

Le milieu de fermentation doit contenir essentiellement une source de carbone et une source d'azote assimilables, des éléments minéraux (notamment des sulfates) et éventuellement des facteurs de croissance, tous ces éléments pouvant être apportés sous forme de produits bien définis ou dans des mélanges complexes, tels qu'on en rencontre dans des produits biologiques d'origines diverses.

Comme source de carbone assimilable, on peut utiliser des hydrates de carbone, tels que le glucose, le maltose, les dextrines, l'amidon ou d'autres substances carbonées comme des sucres-alcools (glycérol) ou comme certains acides organiques (acides lactique, citrique).

Certaines huiles animales ou végétales, comme l'huile de lard ou l'huile de soja, peuvent avantageusement remplacer ces différentes sources carbonées ou leur être adjointes.

Les sources convenables d'azote assimilable sont extrêmement variées. Elles peuvent être des substances chimiques très simples comme les sels minéraux ou organiques d'ammonium, l'urée, certains acides aminés. Elles peuvent aussi être apportées par des substances complexes contenant principalement l'azote sous forme protidique telles que la caséine, la lactalbumine, le gluten et leurs hydrolysats, les farines de soja, d'arachide, de poisson, les extraits de viande, de levure, les distillats solubles, les infusions de céréales (notamment le corn steep).

Parmi les éléments minéraux ajoutés, certains peuvent avoir un effet tampon ou neutralisant comme les phosphates alcalins ou alcalino-terreux ou les carbonates de calcium et de magnésium. D'autres apportent l'équilibre ionique nécessaire au développement de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 comme les chlorures ou sulfates des métaux alcalins et alcalino-terreux. Enfin, certains agissent plus spécialement comme activateurs de la multiplication des cellules; ce sont les sels de zinc, de cobalt, de fer, de cuivre, de manganèse.

Le pH du milieu de fermentation au départ de la culture doit être compris entre 6,0 et 7,8 et de préférence entre 6,5 et 7,8. La température optimale pour la fermentation est de 25 à 30°C, mais une production satisfaisante est obtenue à des températures comprises entre 23 et 33°C. L'aération de la fermentation peut varier entre des valeurs assez larges. On a cependant trouvé que des aérations de 0,3 à 3 l d'air par litre de bouillon et par minute conviennent particulièrement bien. Le rendement maximal est obtenu après 2 à 8 d de culture, ce temps dépendant essentiellement du milieu utilisé.

D'après ce qui précède, on conçoit que les conditions générales de la culture de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 peuvent varier dans une assez large mesure et être adaptées à chaque nécessité particulière.

Les cellules de *Streptomyces stimulosus* sont séparées du milieu de fermentation par centrifugation. Généralement, cette opération s'effectue en continu. Les cellules ainsi obtenues peuvent être purifiées et partiellement délipidées par lavages successifs au moyen d'un solvant organique tel que le méthanol, l'éthanol ou l'éther éthylique ou par un mélange de ces solvants.

Les cellules de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 sont délipidées selon les méthodes habituelles, c'est-à-dire par des lavages successifs au moyen d'un solvant organique tel que le chlorure de méthylène, le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone.

Généralement, au cours de chaque lavage, les cellules sont agitées dans le chloroforme à une température voisine de 20°C pendant 15 à 35 h.

Après chaque lavage, les cellules sont filtrées et séchées sous pression réduite à une température comprise entre 25 et 45°C.

Les cellules délipidées ainsi obtenues sont soumises à plusieurs autolyses successives à une température voisine de 37°C pendant environ 48 h. Il est particulièrement avantageux d'opérer en présence d'un agent capable d'éviter les fermentations parasites. De préférence, on utilise le benzène ou le toluène.

Chaque autolyse s'effectue en agitant lentement les cellules délipidées en suspension dans l'eau. Après chaque opération, la phase aqueuse limpide est séparée de la phase solide par centrifugation et l'opération suivante d'autolyse est effectuée sur le culot de centrifugation. Généralement, il est avantageux de réaliser 2 ou 3 opérations d'autolyse.

Les phases aqueuses limpides réunies, qui contiennent l'extrait 34129 R.P. sont ensuite fractionnées par filtration à travers des supports convenables.

De préférence, pour effectuer cette séparation, on utilise des membranes de porosité convenable, telles que la membrane Amicon UM 20 et la membrane Amicon UM 2.

Généralement, l'ultrafiltration de la phase aqueuse limpide est effectuée d'abord à travers une membrane permettant de séparer les produits de haut poids moléculaire, puis le perméat obtenu est ultrafiltré à travers une membrane qui permet de séparer les produits de bas poids moléculaire, l'extrait 34129 R.P. étant contenu dans le rétentat de cette ultrafiltration. Par lyophilisation de ce rétentat, on obtient l'extrait hydrosoluble 34129 R.P.

Les composés selon l'invention, c'est-à-dire provenant du couplage avec des acides gras des produits de départ, eux-mêmes obtenus par purification de l'extrait hydrosoluble 34129 R.P., sont des adjuvants immunologiques exerçant leur activité potentialisatrice sur la production d'anticorps et sur les réactions d'hypersensibilité retardée; ils sont non arthrogènes, capables d'exercer leur activité adjuvante en solution ou suspension aqueuse, sans qu'il soit nécessaire de les administrer en solution huileuse. Administrés en solution aqueuse, ils exercent un pouvoir adjuvant significatif, nettement plus marqué que celui des extraits hydrosolubles non couplés dont ils dérivent. Ce pouvoir adjuvant est déterminé par des tests d'hypersensibilité et de production d'anticorps chez le cobaye en utilisant comme antigène par exemple l'ovalbumine [selon le principe de la méthode de R.G. White *et al.*, «Immunology», 7, 158 (1964)]. Le pouvoir adjuvant chez le cobaye s'exerce à des doses comprises entre 0,01 et 0,5 mg/kg. Les composés selon l'invention exercent, *in vitro*, à des concentrations de 0,1 à 100 µg/cm³, une activité mitogène sur les lymphocytes spléniques de la souris.

Les composés selon l'invention se montrent également actifs dans la technique de Jerne chez la souris où, administrés par voie intraveineuse à des doses comprises entre 0,1 et 25 mg/kg, ils exercent une action stimulante sur la production de cellules formatrices d'anticorps dans la rate.

A tous ces égards, les composés résultants du couplage avec l'anhydride laurique se sont révélés intéressants. On préfère particulièrement le composé de formule (III).

On notera que, dans le composé de formule (III), X et Y peuvent être identiques ou différents et représenter

- soit tous deux un radical RCO,
- soit l'un un radical RCO et l'autre un atome d'hydrogène, si bien que le composé (III) peut être un composé unique ou un mélange. Dans ce qui suit, l'expression composé (III) couvre aussi bien ledit mélange que ses constituants individuels.

L'exemple suivant, donné à titre non limitatif, illustre la présente invention.

Exemple

On dissout 15 mg du produit de formule (I) dans 5 cm³ d'un mélange d'une solution aqueuse 0,5M de carbonate de sodium et d'alcool butylique tertiaire (7/3 en volumes). On ajoute goutte à goutte, sous agitation et à une température voisine de 20°C, 0,5 cm³ d'alcool butylique tertiaire contenant 60 mg d'anhydride laurique. Après avoir agité pendant 30 min, on ajoute de l'alcool butylique tertiaire jusqu'à obtention d'un taux d'alcool butylique tertiaire de

80%. Il se forme alors un précipité que l'on sépare par centrifugation (3000 tr/min pendant 10 min). Le précipité est lavé 2 fois par 10 cm³ d'alcool butylique tertiaire et centrifugé à chaque fois dans les mêmes conditions que ci-dessus. Tous les surnageants de centrifugation sont réunis et concentrés à sec à l'évaporateur rotatif sous pression réduite (20 mm de mercure) à une température inférieure à 30°C. Le résidu d'évaporation est repris par 50 cm³ d'eau distillée et dialysé à travers une membrane Diaflo (Amicon) UM 05, afin d'éliminer la majorité de l'acide laurique provenant de l'hydrolyse de l'anhydride laurique n'ayant pas réagi. La solution qui n'a pas dialysé est lyophilisée. On obtient ainsi 30 mg d'une poudre blanche amorphe contenant encore 10% d'acide laurique. 30 mg de ladite poudre sont filtrés sur Spherosil XOA-400 (qui est une résine à base de silice en particules sphériques poreuses de granulométrie comprise entre 100 et 200 µ, dont le volume poreux est de 1 ml/g et le diamètre des pores voisin de 80 Å, mise sur le marché par Rhône-Poulenc Industries), dans une colonne de 25 × 1 cm dans le solvant chloroforme/méthanol/eau (75/25/2). L'acide laurique est élué dans le volume mort de la colonne et le composé (III) est élué par le mélange butanol tertiaire/eau (50/50). La composition relative des acides aminés dans le composé (III), déterminée par un autoanalyseur après hydrolyse totale, est la suivante (entre parenthèses est indiqué le nombre entier le plus proche en accord avec des expériences effectuées après différents temps d'hydrolyse): Ala: 1,08 (1); Glu: 0,79 (1); Gly: 1,0 (1); Dap = 0,83 (1). Le spectre infrarouge de cette substance est représenté par la fig. 1.

Le produit de départ de formule (I) peut être obtenu de la manière suivante:

300 mg d'extrait 34129 R.P. (extrait de *Streptomyces stimulosus*) sont dissous dans 2 cm³ de solution aqueuse d'acide acétique 0,01N. La solution est filtrée sur une colonne de 2,40 m de hauteur et de 2 cm de diamètre remplie de Biogel P 10 (Biorad) en éluant avec de l'acide acétique 0,01N. La substance recherchée est éluée entre 400 et 550 cm³. Elle est filtrée à nouveau sur une colonne identique à la précédente en éluant toujours avec une solution aqueuse d'acide acétique 0,01N. Après avoir éliminé une première fraction de 170 cm³, on recueille l'éluat passant entre 200 et 230 cm³. Cet éluat est passé successivement sur deux colonnes de 2,40 m de hauteur et de 1,2 cm de diamètre remplies respectivement de Biogel P 4 et de Biogel P 2 en éluant avec une solution aqueuse d'acide acétique 0,01N. Après avoir élué la dernière colonne avec 135 cm³ du solvant d'éluat, on recueille la fraction sortante entre 135 et 140 cm³; celle-ci, après lyophilisation, fournit 15 mg d'un mélange des produits de formules (I) et (II) dans les proportions molaires 4/1, sous la forme d'une poudre blanche amorphe dans laquelle les acides aminés, déterminés avec un autoanalyseur après hydrolyse totale, se trouvent dans les proportions suivantes: Ala: 1,27 (1); Glu: 1,0 (1); Gly: 1,0 (1); Dap: 1,07 (1) (entre parenthèses est indiqué le nombre entier le plus proche).

Les peptides (15 mg) ainsi obtenus après filtration sur Biogel P 2 sont chromatographiés sur une colonne Dowex 50 × 4 (100 × 1,4 cm) tamponnée au départ à pH 2,2 avec un solvant pyridine/acide acétique/eau (16/130/854 en volumes) ajusté au pH désiré avec de l'acide formique. Avec un gradient d'éluat de 500 cm³, le pH étant alors de 4,1, le tétrapeptide de formule (I) est obtenu. Il est purifié par filtration sur une colonne de Biogel P 2 en éluant avec 240 cm³ d'acide acétique 0,01M.

On obtient ainsi 7,5 mg de tétrapeptide de formule (I). Il a été vérifié par dansylation que ce peptide donne bien naissance à des quantités égales de dansyl-Gly et de dansyl-Ala. Le spectre IR de cette substance est représenté par la fig. 2.

L'extrait de *Streptomyces stimulosus* DS 25556 (NRRL 5776) désigné sous le numéro 34129 R.P. peut être obtenu de la manière suivante:

a) Fermentation

On charge dans un fermenteur de 170 l:

peptone	1200 g
extrait de levure	600 g

glucose monohydraté	1200 g
amidon partiellement hydrolysé	2400 g
eau de ville: complément pour 110 l	

Le pH est ajusté à 7,30 par addition de 40 cm³ de soude 10N. On stérilise le milieu par barbotage de vapeur à 122°C pendant 40 min. Après refroidissement, du fait de la condensation de la vapeur en cours de stérilisation, le volume du bouillon est de 120 l; le pH est de 7,00. On ensemence avec 200 cm³ d'une culture en Erlenmeyer agitée de *Streptomyces stimulus* DS 25556. La culture est développée à 30°C pendant 23 h en agitant et en aérant de l'air stérile; elle est alors convenable pour l'ensemencement de la culture productrice.

La culture productrice est effectuée dans un fermenteur de 800 l, chargé avec les substances suivantes:

corn steep (à 50% de matières sèches)	8 kg
huile de soja	6 l
sulfate d'ammonium	0,8 kg
solution de chlorure de cobalt hexahydraté à 20 g/l	0,4 l
eau de ville q.s.p.	360 l

Après avoir ajusté le pH à 6,40 par addition de 600 cm³ de soude 10N, on ajoute:

carbonate de calcium: 2 kg

Le pH du milieu est alors égal à 6,50. On stérilise le milieu par barbotage de vapeur à 122°C pendant 40 min. Après refroidissement, du fait de la condensation de la vapeur au cours de la stérilisation, le volume du bouillon est de 390 l; il est complété à 400 l par addition de 10 l de solution aqueuse stérile contenant:

glucose monohydraté: 4 kg

Le pH du milieu est alors égal à 7,00. On ensemence avec 40 l de la culture inoculum en fermenteur de 170 l décrite ci-dessus. La culture est développée à 27°C durant 71 h en agitant avec une turbine tournant à 205 tr/min et en aérant avec un volume d'air stérile de 20 m³/h; le pH de la culture est alors de 7,45 et le volume du moût de 380 l.

b) Isolement des cellules

100 l du moût obtenu précédemment sont centrifugés en continu pour séparer les cellules, sous 3000 g (4000 tr/min) et au débit de 50 l/h.

On recueille ainsi 6,4 kg de cellules humides. La pâte de cellules est diluée dans 20 l d'éthanol. Le produit insoluble est isolé par centrifugation sous 3000 g (4000 tr/min) et au débit de 25 l/h.

On obtient ainsi 2,4 kg de cellules humides qui sont reprises dans un mélange de 7 l d'éthanol et de 7 l d'éther éthylique. On laisse reposer la suspension pendant 24 h à une température voisine de 20°C.

L'insoluble est séparé par centrifugation sous 3000 g (4000 tr/min) et au débit de 25 l/h, puis séché sous pression réduite (5 mm de mercure) à 35°C.

On isole ainsi 852 g de cellules de *Streptomyces stimulus* DS 25556.

c) Délipidation des cellules

750 g de cellules séchées de *Streptomyces stimulus* DS 25556 sont mises en suspension dans 6 l de chloroforme et agitées pendant 24 h à une température voisine de 20°C. Après essorage sur un buchner muni d'un papier-filtre, le chloroforme est éliminé. Les cellules sont traitées ensuite trois fois comme précédemment. Les cellules isolées sont séchées sous pression réduite (5 mm de mercure) et à 35°C. On obtient ainsi 690 g de cellules de *Streptomyces stimulus* DS 25556 délipidées.

d) Autolyse des cellules

30 g de cellules délipidées obtenues comme indiqué précédemment sont mises en suspension dans 500 cm³ d'eau contenant 0,5 cm³ de toluène. La suspension est agitée pendant 48 h à 37°C, puis elle est centrifugée pendant 30 min à 15 000 g. Le surnageant est isolé pour être traité ultérieurement et le culot est remis en suspension dans 500 cm³ d'eau et 0,5 cm³ de toluène et la suspension est

agitée pendant 48 h à 37°C. Le surnageant est isolé comme précédemment et le culot soumis une troisième fois à l'autolyse dans les mêmes conditions, un troisième surnageant est isolé.

Les trois surnageants obtenus sont traités ultérieurement selon le même procédé et peuvent être utilisés ensemble ou séparément.

e) Traitement sur membrane ultrafiltrante

300 cm³ de surnageant précédemment obtenu sont ultrafiltrés sur membrane Amicon UM 20. La solution est d'abord concentrée à environ 100 cm³, puis est dialysée par 500 cm³ d'eau en restant à volume constant 100 cm³. Le rétentat obtenu est éliminé et le perméat est ultrafiltré sur une membrane Amicon UM 2 pour être d'abord concentré à environ 100 cm³, puis ensuite dialysé par 1000 cm³ d'eau en maintenant le volume constant à 100 cm³.

Le perméat est éliminé et le rétentat est lyophilisé. On obtient ainsi 155 mg de substance hydrosoluble 34129 R.P. dont les caractéristiques sont les suivantes:

Analyse élémentaire:

C 40,4-41,4 H 6,7-6,9 N 8,0-10,6%

Composition

a) en acides aminés: alanine (5-7%), acide glutamique (7-10%), glycine (2,5-4%), acide α,α -diaminopimélique (5-8%);

b) en sucres aminés: N-acétylglucosamine (5-10%), acide mura-

mique (5-10%). La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques qui contiennent au moins un composé selon l'invention, en association avec un ou plusieurs diluants ou excipients compatibles et pharmaceutiquement acceptables. Ces compositions peuvent être utilisées comme adjuvants de vaccins (par exemple vaccin antigrippal composé de sous-unités hémagglutinantes, vaccin antipolyomyélique à virus inactivé, vaccin antimalarique) en injection simultanée avec l'antigène (viral, bactérien, parasitaire, fongique, tumoral) à l'égard duquel on souhaite augmenter la production d'anticorps ou la réactivité cellulaire spécifique. Leurs propriétés adjuvantes peuvent être également mises à profit dans les procédés de désensibilisation contre les allergènes (pollens, etc.).

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être également employées comme immunostimulants non spécifiques en vue d'augmenter la résistance de l'hôte (homme ou animal domestique) vis-à-vis des infections, ou en immunothérapie antitumorale.

En tant qu'adjuvants les produits peuvent être administrés soit en solution aqueuse, soit en émulsion huileuse, soit encore sous forme de liposomes avec l'antigène à l'égard duquel on souhaite obtenir une réponse immunitaire augmentée ou améliorée par la voie utilisée pour cet antigène (par exemple sous-cutanée ou intramusculaire) et dans des proportions variant entre 0,01 et 10 fois la quantité d'antigène avec lequel ils sont mélangés avant d'être injectés.

Pour l'application comme immunostimulant non spécifique, ces produits peuvent être utilisés par voie intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intranasale, éventuellement orale ou rectale, soit en solution aqueuse, soit en émulsion huileuse, soit encore sous forme de liposomes. Dans ce cas, la dose de composé selon l'invention qui est administrée est généralement comprise entre 0,01 et 25 mg/kg. En thérapeutique humaine, les doses journalières dépendent de l'effet recherché. Elles peuvent être comprises entre 0,1 et 10 mg pour un adulte.

Comme compositions solides pour administration orale peuvent être utilisés des comprimés, des pilules, des poudres ou des granulés. Dans ces compositions, le produit actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants tels que saccharose, lactose ou amidon. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les diluants, par exemple un lubrifiant, tel que le stéarate de magnésium.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des émulsions pharmaceutiquement acceptables, des solutions, des suspensions, des sirops ou des élixirs contenant des diluants inertes, tels que l'eau ou l'huile de paraffine. Ces composi-

tions peuvent comprendre des substances autres que les diluants, par exemple des produits mouillants, édulcorants ou aromatisants.

Les compositions pour administration parentérale peuvent être des solutions stériles aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme véhicule, dans ces derniers cas, on peut employer le polyéthylèneglycol, le propylèneglycol, les huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, et les esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle. Ces compositions peuvent contenir également des adjuvants, en particulier des agents mouillants, émulsifiants ou dispersants.

La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple à l'aide d'un filtre bactériologique, en incorporant à la composition des agents stérilisants ou par chauffage. Elles peuvent être également préparées sous forme de compositions solides rendues stériles par irradiation (rayons β) qui peuvent être dissoutes dans de l'eau stérile ou dispersées dans tout autre milieu stérile injectable, éventuellement au moment de l'emploi.

Les compositions pour administration intranasale peuvent être des solutions stériles aqueuses, des suspensions ou des émulsions qui peuvent être éventuellement associées à un agent propulseur compatible.

Les compositions pour administration rectale sont des suppositoires qui peuvent contenir, outre le produit actif, des excipients, tels que le beurre de cacao ou le produit connu sous la dénomination suplocire.

L'exemple suivant, donné à titre non limitatif, illustre une composition selon l'invention.

Exemple

On prépare selon la technique habituelle une solution administrable par voie intraveineuse ayant la composition suivante:

- substance hydrosoluble préparée selon l'invention, décrite à l'exemple 1: 50 mg,
- soluté injectable: 5 cm³.

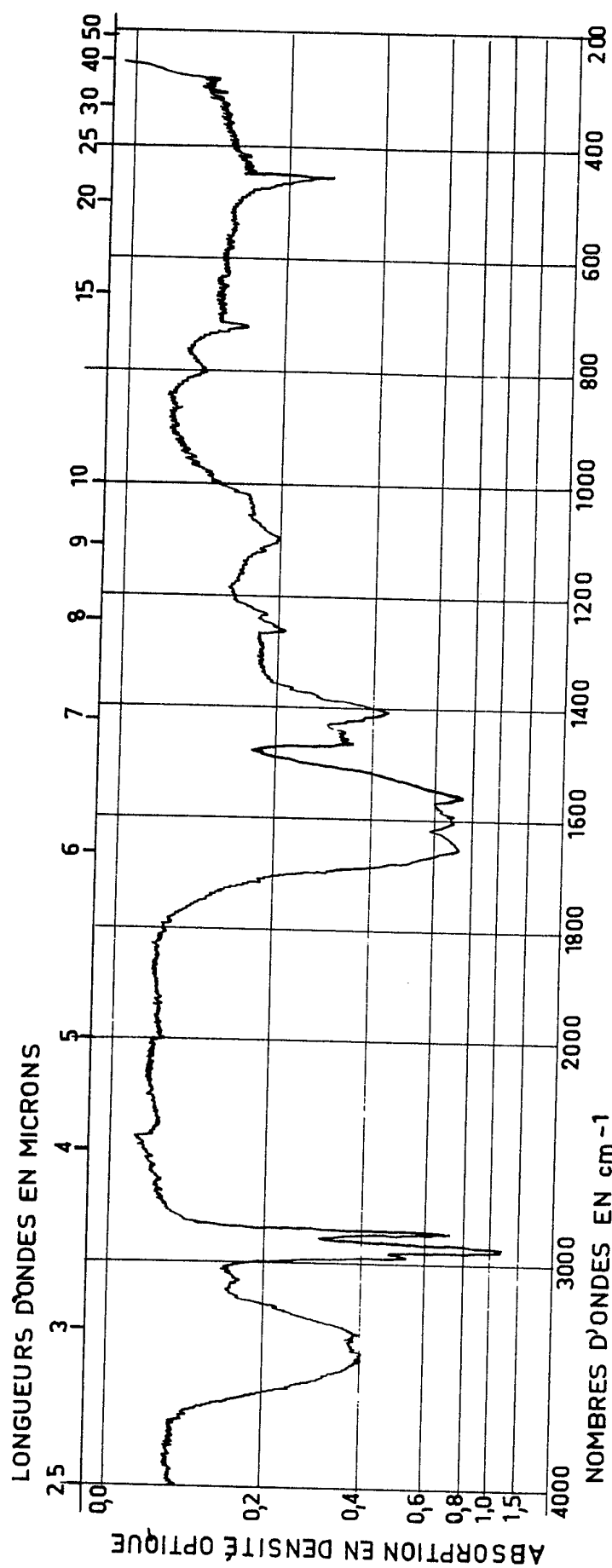


FIG.1

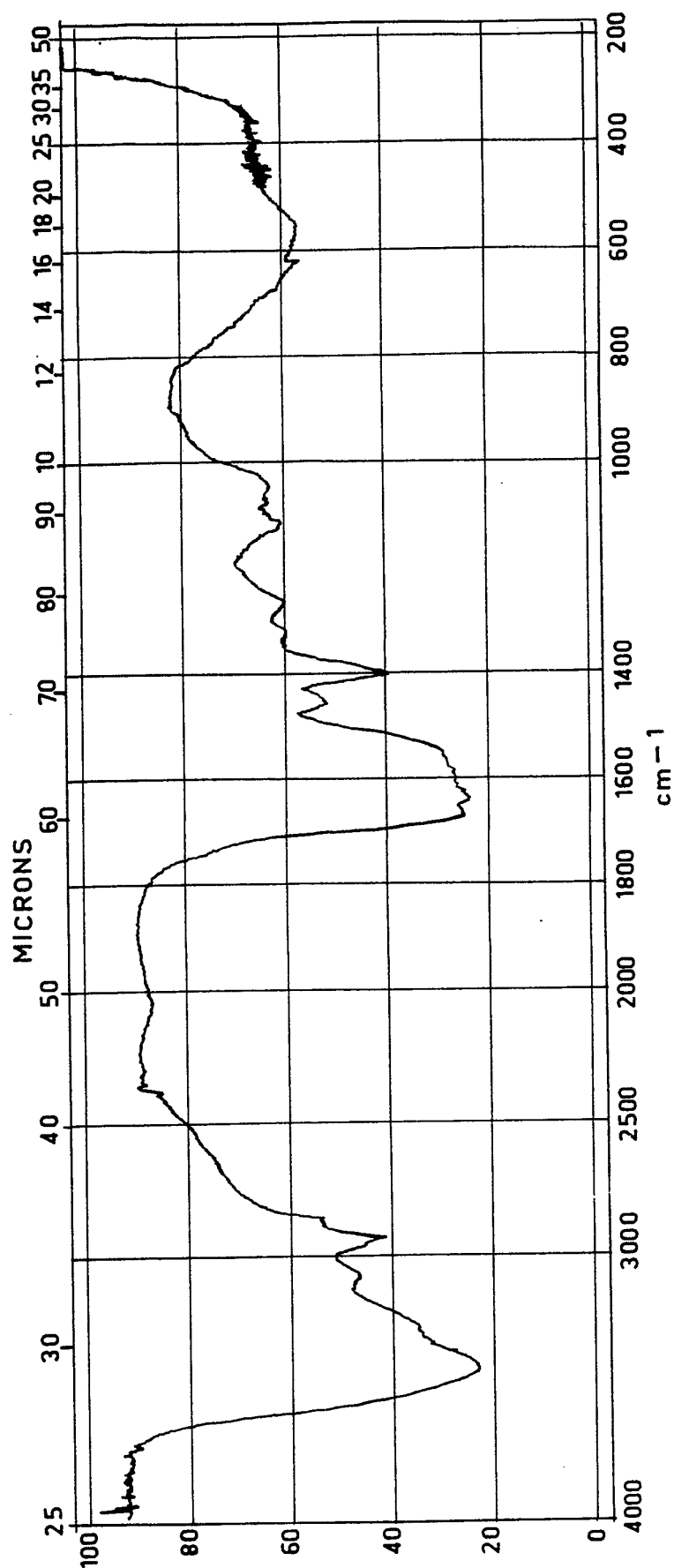


FIG.2

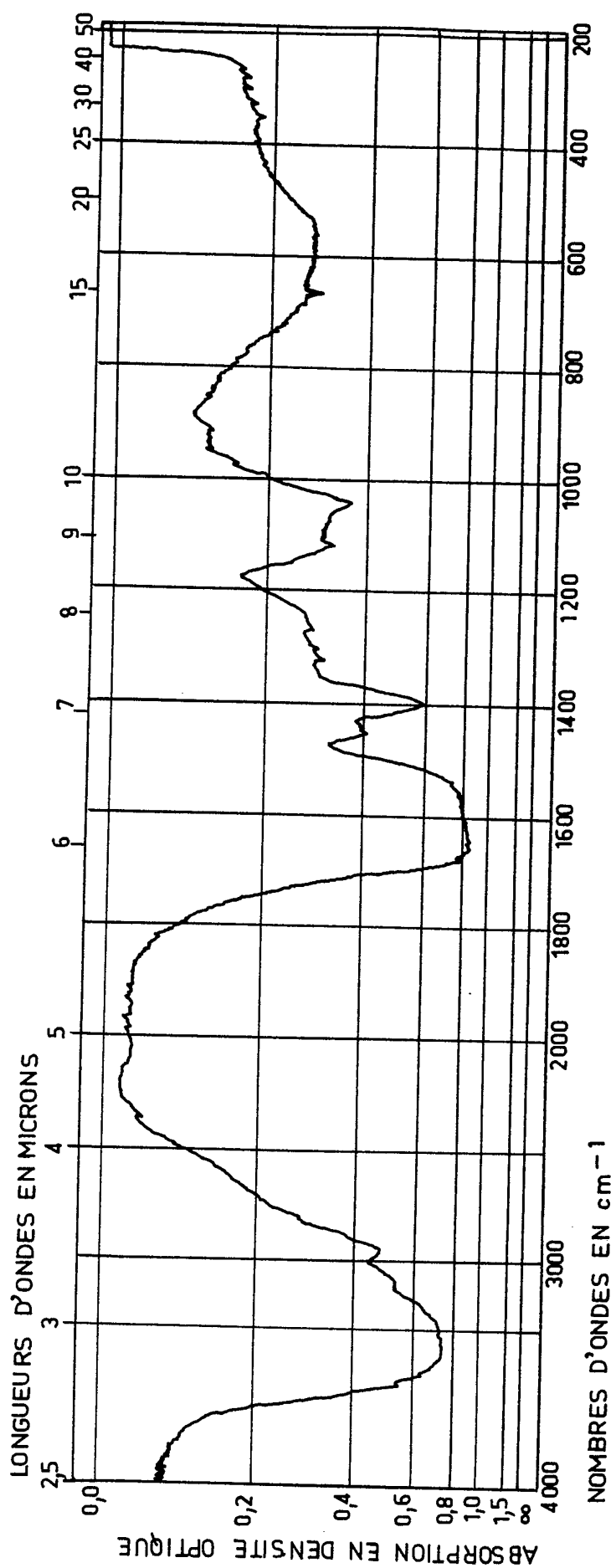


FIG.3