



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 889.955

Classif. Internat.: C07 G/A61K

Mis en lecture le: 15 -02- 1982

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention ;

Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle ;

Vu le procès-verbal dressé le 13 août 1981 à 15 h. 00

au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. — *Il est délivré à la Sté dite : SANDOZ S.A.*

Lichtstrasse 35, CH-4002 Bâle (Suisse),

*élisant domicile chez Sandoz S.A., chaussée de Haecht 226
1030 Bruxelles,*

*un brevet d'invention pour : Nouveaux antibiotiques obtenus à partir
d'une souche de genre Cryptosporiopsis, leur préparation
et leur application en thérapeutique,*

*qu'elle déclare avoir fait l'objet de demandes de brevet
déposées en Suisse le 15 août 1980, n° 6196/80 et le
1er octobre 1980, n° 7330/80*

Article 2. — *Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.*

*Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui
de sa demande de brevet.*

Bruxelles, le 15 février 1982

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

Le Directeur

L. SALPETEUR



MEMOIRE DESCRIPTIF

déposé a l'appui d'une demande
de

BREVET D'INVENTION

formée par
SANDOZ S.A.
pour

Nouveaux antibiotiques obtenus à partir d'une
souche de genre Cryptosporiopsis, leur préparation
et leur application en thérapeutique

Invention de: Hans Tscherter et
Michael M. Dreyfuss

Revendication de la priorité des demandes de
brevets déposées en SUISSE le 15 août 1980 sous
le n° 6196/80 et le 1er octobre 1980 sous le
n° 7330/80 au nom de SANDOZ S.A.

Case: 100-5455

La présente invention a pour objet de nouveaux antibiotiques qui seront désignés par la suite par S 41062/F-1, S 41062/F-6 et S 41062/F-7, leur préparation et leur application en thérapeutique, à titre

5 de principes actifs de médicaments.

Les nouveaux composés S 41062/F-1, S 41062/F-6 et S 41062/F-7 présentent les caractéristiques suivantes :
S 41062/F-1

- Il se présente sous la forme d'une poudre micro-cristal-
 10 line blanche fondant à 235-240°C (décomposition gra-
 duelle, en particulier à une température >265°C)
- $[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$ (c = 0,5 dans le méthanol)
- Spectre ultra-violet dans le méthanol
 $\lambda_{\max} 193 \text{ nm } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 786$
 15 (222)nm " = 140
 279 nm " = 14
- Spectre infra-rouge dans le bromure de potassium :
 voir figure 1;
- 20 - Spectre de RMN sur protons (90 MHz dans le diméthyl-
 sulfoxyde; substance de référence : tétraméthylsilane):
 voir figure 4;
- Spectre de RMN sur le carbone 13 dans le méthanol
 tétradeutééré (36 mg dans 0,3 ml); substance de
 25 référence : tétraméthylsilane), voir tableau II, colonne A;
- en spectrométrie de masse, on observe des pics par
 désorption de champ : $M (+\text{Li})^+ 1055$ et $M (+\text{Na})^+ 1071$
 correspondant à la formule empirique $\text{C}_{50}\text{H}_{80}\text{N}_8\text{O}_{16}$
 d'un poids moléculaire de 1048;
- 30 - Analyse élémentaire après séchage à la température
 ambiante sous vide poussé:

Calculé: ($\text{C}_{50}\text{H}_{80}\text{N}_8\text{O}_{16}$) :

C = 57,3% : H=7,7% : N=10,7% : O=24,4%

Trouvé:

35 C=55,7% : H=7,7% : N=10,1% : O=24,7%

C=56,5% : H=7,8% : N=10,5% : O=24,1%

Solubilité : S 41062/F-1 se dissout bien dans le méthanol, l'éthanol, la pyridine et le diméthylsulfoxyde (DMSO); il est difficilement soluble dans l'eau, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'éther, le benzène et l'hexane;

5 - le composé est stable dans le méthanol aqueux à pH 4 à 7. Sous des conditions alcalines ou fortement acides il se décompose en perdant son activité anti-fongique.

- L'hydrolyse acide, effectuée dans de l'acide chlorhydrique 6N à 110°C pendant 24 heures donne, comme
10 produit de dégradation, un acide gras saturé qui, sous forme de son ester méthylique, présente en spectrométrie de masse un pic M^+ à 270.

- Analyse des amino-acides (selon la méthode de Stein et Moore)

15 On obtient des produits de dégradation ayant des temps de rétention analogues ou similaires à ceux, par exemple, de l'acide aspartique, de l'hydroxyproline, de la sérine et de l'ammoniac ainsi qu'un amino-acide inconnu ayant un temps de rétention compris
20 entre celui de la leucine et de la tyrosine.

Le composé S 41062/F-1 est un hexapeptide cyclique neutre portant un reste d'acide gras saturé, ramifié, contenant 16 atomes de carbone et fixé par l'intermédiaire d'un groupe amide. D'après les études de détermination de structure (analyse d'acides aminés, éthé-
25 rification) et les données spectrométriques (spectre de RMN sur protons et carbone 13), on suppose que les amino-acides suivants sont présents: la sérine, la 4-hydroxyproline, la 4-méthyl-3-hydroxyproline,
30 la 3-hydroxy-homo-tyrosine et probablement la 4,5-dihydroxy-ornithine. Le sixième amino-acide inconnu contient un groupe carbamoyl et, probablement, une fonction hydroxy secondaire. L'antibiotique S 41062/F-1 possède la structure suivante :



Activité anti-fongique : voir tableau V

20

25

- Spectre ultra-violet dans le méthanol :

$$(222) \text{ nm} \frac{1}{\text{nm}} \text{ cm} = 340$$

30

- Spectre infra-rouge dans le bromure de potassium :
voir figure 2;

- Spectre de RMN sur protons (90 MHz dans le DMSO; substance de référence : tétraméthylsilane) : voir figure 5;

35

deutére (44 mg dans 0,3 ml; substance de référence :

tétraméthylsilane) : voir tableau II, colonne B;

- Analyse élémentaire après séchage à la température ambiante, sous vide poussé :

Trouvé : C=56,3% : H=7,7% : N=10,9% : O=26,0%

5 C=56,8% : H=7,9% : N=10,7% : O=24,8%

- Solubilité : S 41062/F-6 est facilement soluble dans le méthanol, l'éthanol, la pyridine et le diméthylsulfoxyde (DMSO); il est difficilement soluble dans l'eau, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'éther, le benzène et l'hexane ;
- le composé est stable dans le méthanol aqueux à pH 4 à 7. Sous des conditions alcalines ou fortement acides, il se décompose en perdant son activité anti-fongique.
- l'hydrolyse acide effectuée dans de l'acide chlorhydrique 15 6N à 110°C pendant 24 heures donne, comme produit de dégradation, un acide gras saturé qui, sous forme de son ester méthylique, présente en spectrométrie de masse un pic M^+ à 270;
- Analyse des amino-acides (selon la méthode de Stein et Moore)

20 On obtient des produits de dégradation dont les temps de rétention sont analogues ou similaires, par exemple, à ceux de l'acide aspartique, de l'hydroxyproline, de l'allo-hydroxyproline, de la sérine et de l'ammoniac ainsi qu'un amino-acide inconnu ayant un temps de 25 rétention compris entre celui de la leucine et de la tyrosine;

- Chromatographie en couche mince: voir tableau I;
 - Activité anti-fongique : voir tableau V.
- 30 S 41062/F-7

Il se présente sous la forme d'une poudre blanche fondant à partir de 205°C (suintement avec décomposition graduelle);

- $[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$ (c = 0,5 dans le méthanol)
 - Spectre ultra-violet dans le méthanol
- 35 $\lambda_{\max} \quad 194 \text{ nm} \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} = 890$

$$(222) \text{ nm } E^{1\%}_{1 \text{ cm}} = 339$$

$$278 \text{ nm } " = 15$$

- Spectre infra-rouge dans le bromure de potassium :
- 5 voir figure 3;
- Spectre de RMN sur protons (90 MHz dans le DMSO; substance de référence : tétraméthylsilane) : voir figure 6;
- Spectre de RMN sur carbone 13 dans le méthanol tétra-
- 10 deutéré (38 mg dans 0,25 ml; substance de référence: tétraméthylsilane): voir tableau II, colonne C;
- Analyse élémentaire après séchage à la température ambiante sous vide poussé :
- Trouvé C=54,5% : H=7,5% : N=9,9% : O=25,0%
- C=55,1% : H=7,5% : N=10,2%
- 15 Après avoir dissous un échantillon dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'isopropanol, on agite la solution avec de l'acide chlorhydrique très dilué, on l'évapore puis on fait précipiter à partir de méthanol avec de l'acétone. L'analyse élémentaire subséquente
- 20 donne les résultats suivants :
- Trouvé : C=57,4% : H=8,0% : N=11,0% : O=24,6%
- C=56,0% : H=7,9% : N=10,3% : O=24,8%
- Solubilité : S 41062/F-7 se dissout bien dans le méthanol, l'éthanol, la pyridine et le diméthylsulfoxyde
- 25 (DMSO); il est difficilement soluble dans l'eau, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'éther, le benzène et l'hexane,
- l'hydrolyse acide, effectuée avec de l'acide chlorhydrique 6N à 110°C pendant 24 heures donne, comme produit
- 30 de dégradation, un acide gras saturé qui, d'après les temps de rétention observés en chromatographie en phase gazeuse et les pics moléculaire et de fragmentation déterminés par spectrométrie de masse, pourrait être l'acide diméthylmyristique.
- 35 - Analyse des amino-acides On obtient des produits de

dégradation ayant des temps de rétention analogues ou similaires à ceux par exemple de l'acide aspartique, de l'hydroxypyroline/allo-hydroxyproline, de la sérine et de l'ammoniac ainsi qu'un autre amino-acide ayant un temps de rétention compris entre celui de la leucine et de la tyrosine.

Chromatographie en couche mince : voir tableau I

Activité anti-fongique : voir tableau V

10

T A B L E A U I

La chromatographie en couche mince sur plaques de gel de silice (épaisseur des plaques 0,25 mm, Merck) donne les valeurs Rf suivantes :

15

Eluant.	S 41062/F-1	S 41062/F-6	S 41062/F-7	Substance de référence : Echinocandine B
Chlorure de méthylène/ méthanol	0,25	0,20	0,40	0,28
Chlorure de méthylène/ méthanol/eau (71:25:4)	0,32	0,31	0,42	0,35

20

25

Pour révéler les composés de l'invention sur les chromatogrammes en couche mince, on peut utiliser de la vapeur d'iode ou vaporiser d'autres réactifs appropriés. On peut par exemple préparer un réactif vaporisable approprié en dissolvant 100 mg de chlorure ferrique dans 1 ml d'acétate d'éthyle et en y ajoutant 100 ml d'acide sulfurique concentré exempt de nitrate. On vaporise ce réactif sur les chromatogrammes en couche mince complètement secs de solvant puis on chauffe en utilisant un appareil de chauffage à incandescence jusqu'à apparition de fortes taches brunes.

30

35

T A B L E A U II

Spectres de RMN sur carbone 13 (spectromètre Bruker HX-90-E
à 22,63 MHz ; fréquence de balayage : 6000 Hz)

S 41062/F-1	S 41062/F-6	S 41062/F-7
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
176,9	176,9	176,1
176,0	176,0	174,0
174,0	174,0	173,5
173,5	173,7	172,8
172,7	172,6	171,8
171,8	172,0	169,0
169,0	169,1	157,0
157,0	156,9	131,4
131,4	131,4	129,7
129,7	129,7	116,2
116,1	116,1	76,2
81,5	73,9	74,3
76,2	71,2	71,2
74,3	70,6	70,6
71,2	69,7	69,9
70,5	63,6	69,5
69,9	62,3	63,6
63,6	57,4	62,4
62,3	56,1	57,3
57,3	55,4	56,0
56,1	50,8	55,4
55,4	49,8	51,8
53,0	48,9	50,8
51,8	48,0	49,9
50,8	47,1	48,9
49,9	45,8	48,0
48,9	40,7	47,1
48,0	39,0	45,8
47,1	38,0	40,6
46,1	36,7	39,0
45,8	34,5	38,0
40,7	32,8	36,7
39,0	31,1	32,8
38,0	30,7	31,1
36,7	30,5	30,6
35,2	30,4	30,3
32,8	30,2	27,9
31,1	27,9	26,9
30,5	26,8	20,7
30,2	20,7	20,1
27,9	20,2	11,2
26,9	11,6	

Conformément au procédé de l'invention, pour préparer les antibiotiques S 41062/F-1, S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7, on cultive sur ou dans un milieu de culture une souche susceptible de produire S 41062/F-1, et/ou S 41062/F-6
5 et/ou S 41062/F-7, par exemple une souche de champignons du genre *Cryptosporiopsis*.

Le procédé de l'invention peut être effectué selon des méthodes connues. Une culture de transfert de la souche produisant S 41062/F-1,
10 S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7 a été déposée le 2.1.1980 auprès du "American Type Culture Collection (ATCC) Rochville, Maryland, USA, et est accessible au public sous le n° ATCC 20594. La culture est également disponible auprès de Sandoz S.A. Bâle, Suisse.

15 Une autre culture de transfert a été déposée le 16.6.1980 auprès du "United States Department of Agriculture (Northern Utilization Research and Development Division), Peoria, Illinois, USA, et est accessible au public sous le n° NRRL 12192.

On peut également utiliser des souches produisant S 41062/F-1, S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7,
20 qui ont été obtenues à partir de la souche mère de ATCC 20594 ou NRRL 12192, par mutation, par exemple par irradiation, traitement avec des substances mutagènes connues, ou par sélection.

25. Caractéristiques de la souche ATCC 20594 (ou NRRL 12192)

Cette souche a été isolée à partir d'une racine de plante recueillie près de Soyhières (Suisse) et forme en culture pure des conidiomes ouverts compacts (acervules). Cette caractéristique permet d'affirmer
30 que la souche, déposée sous le n° ATCC 20595 et NRRL 12192, appartient aux Mélanconiacées. Sur la base des caractéristiques microscopiques et selon la clé de détermination de B.C. Sutton (Ainsworth, Sparrow & Sussman: The Fungi, v.IVa., Academic Press 1973, chapitre 11, p. 555), le champignon
35 peut être rattaché au genre *Cryptosporiopsis* Bub & Kab. A l'exception de quelques rares caractéristiques indéter-

minables, cette classification est en bonne conformité avec celle de J.A. von Arx (A Revision of the Fungi classified as Gloeosporium, Bibliotheca Mycologica, v. 24, J.Cramer, 1970, pp. 5,6, 27-29). Etant donné

5 que l'on n'a pas observé de fructifications sur le substrat d'origine, que jusqu'à présent l'on n'a pas pu observer d'état parfait et que les descriptions de culture acceptables sur le plan de la taxonomie sont très rares dans la littérature

10 (J.W. Groves 1939 : Some Pezicula species and their conidial stages, Can. J. Research 17, 125-143; J.W. Groves 1939 : Some Pezicula species occurring on alnus, Mycologia 32, 112-123; J.W. Groves 1941 : Pezicula carnea and Pezicula subcarnea, Mycologia 33, 510-522;

15 J.W. Groves 1947: Pezicula Morthieri on Rhamnus, Mycologia 39, 328-333), une classification plus précise semble ne pas pouvoir être établie actuellement.

Les données physiologiques et morphologiques suivantes sont caractéristiques de la souche Cryptosporiopsis ATCC 20594 produisant les antibiotiques S 41062/F-1,

20 S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7 : la croissance est bonne en milieu gélosé de préférence à température inférieure. Les températures minimales et maximales de croissance sont respectivement de 0° et 31-33°, la croissance optimale

25 s'effectuant entre 15 et 24°C.

Le tableau III ci-après indique les caractéristiques de croissance en fonction de la température et du milieu d'incubation.

Le milieu gélosé en boîtes de Pétri est

30 ensemencé et incubé de manière à obtenir une colonie par boîte ; après une période d'incubation de 14 jours, on mesure le diamètre des colonies (moyenne de 6 colonies en mm), ce qui sert de mesure du rythme de croissance.

Le mycélium aérien d'apparence blanche à crémeuse, trouvé dans la jeune culture sur milieu MA et qui se développe vigoureusement avec un aspect pelucheux à laineux-pelucheux, devient graduellement gris clair à brun gris ou brun clair au cours de l'incubation. Sur la face réverse, les colonies sont de couleur brun ocre à brun châtain et les cultures incubées à environ 27°C excrètent, dans le milieu gélosé, un pigment brun foncé.

Dans un milieu MA liquide (milieu MA sans agar-agar), dont on peut ajuster le pH avec de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium, on observe à pH 2,0 sous agitation à 180 tours/minute et à une température de 21-22°C, une bonne croissance de la souche ATCC 20594 alors qu'à un pH supérieur à 9,3 cette souche ne croît pas. D'une manière générale, on obtient une bonne croissance à un pH compris entre 2,3 et 8,0.

Les températures inférieures sont également préférables pour la sporulation de la souche de *Cryptosporiopsis* ATCC 20594.

Après une incubation de 7 à 10 jours sur un milieu MA à 18°C, il se forme de nombreuses microconodites et macroconidies. Celles-ci se présentent sous la forme de conidiomes (acervules) ayant l'aspect d'un disque, de couleur crème à brun clair et d'un diamètre de 50 à 200 μ , ou sous forme d'agrégats de conidiomes d'une dimension jusqu'à 3 mm; une muqueuse apparaît à la surface des conidiomes.

D'après l'examen microscopique, les cellules conidiogènes présentes dans la couche supérieure des conidiomes peuvent être considérées comme des phialides. Il est fréquent que deux phialides formant des microconidies soient situées directement l'une derrière l'autre; les bases terminales lenticulaires des phialides sont gonflées, et mesurent

6 -10 X 3 - 5 μ . Les phialides inférieures comportent un pore latéral. Les macroconidies formant des phialides sont souvent considérablement plus longues (8-26 x 3-5 μ) et ne sont généralement pas disposées les unes derrière les autres.

Les microconidies, uni-cellulaires, hyalines, sont très petites et de forme cylindrique à légèrement claviforme, l'extrémité la plus large étant arrondie, la plus étroite étant tronquée. D'autre part, les macroconidies, uni-cellulaires, incolores à faiblement ambrées, sont grandes et normalement de forme allantoïde. L'une des extrémités est arrondie, l'autre est tronquée.

Les conditions de culture peuvent avoir une nette influence sur la formation et la dimension des microconidies et des macroconidies, comme indiqué dans le tableau IV.

(Tableau IV voir page suivante)

T A B L E A U IV

Formation et dimensions des macroconidies et microconidies en fonction de la température et du milieu de culture, après 21 jours d'incubation

Température en °C	Longueur x largeur	Milieu gélosé contenant 2% d'extrait de malt		Milieu gélosé Czapek	
		Macroconidies en μ	Microconidies en μ	Macroconidies en μ	Microconidies en μ
4-5°	amplitude	++ 25,5-37,5	-	-	-
	moyenne	x 6,4-9,0 30,8x7,3			
12-13°	amplitude	+++ 27,5-35,7	++ 4,8-6,5	++ 14,5-21,0	-
	moyenne	x 6,4-8,3 31,2x7,0	x 1,1-1,3 5,6x1,2	x 7,3-9,0 18,5-8,1	
14-15°	amplitude	++ 26,0-34,2	+ 4,8-5,7	++ 11,3-21,0	+ 3,2-5,7
	moyenne	x 6,6-8,8 30,0x7,8	x 1,1-1,3 5,2-1,2	x 6,5-9,0 15,3x7,9	x 1,7-2,4
18-19°	amplitude	++ 28,3-35,0	+ 4,0-6,0	-	-
	moyenne	x 6,5-9,0 31,6x7,6	x 1,1-1,3 4,9x1,2		

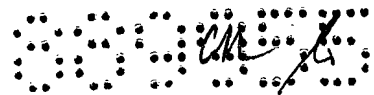
SECRET

(Tableau IV suite).

Température en °C	Longueur x largeur	Milieu gélosé contenant 2% d'extrait de malt	Milieu gélosé Czapek
		Macroconidies en μ	Macroconidies en μ
		Microconidies en μ	Microconidies en μ
21-22°	amplitude	++ 21,0-32,4	+++ 4,0-5,7
	moyenne	x 6,4-9,0 26,7-7,1	x 1,1-1,3 4,8x1,2
24-25°	amplitude	+ 26,0-30,0	+ 4,1-5,8
	moyenne	x 6,6-9,0 27,8x7,9	x 1,1-1,3 4,8-1,2
26,5-27,5	-	-	-

+ = conidies peu nombreuses
 ++ = nombreuses conidies
 +++ = conidies très nombreuses
 - = pas de conidies

On mesure au microscope 10 conidies choisies au hasard pour chaque cas. L'amplitude et la moyenne des longueurs et largeurs sont indiquées en μ .



Les macroconidies mûres présentent de nombreuses petites vacuoles qui se colorent en rouge intense avec le colorant Sudan III et en noir intense avec le colorant Sudan-black B. Les microconidies ne se colorent pas.

5 La germination des macroconidies est optimale à 24°C sur milieu MA à un pH compris entre 3,1 et 3,8 (70 à 80% de germination). A un pH supérieur à 5,5, le taux de germination est inférieur à 5%. Le taux de germination des microconidies est inférieur à 1% sous
10 toutes les conditions essayées.

La nouvelle souche ATCC 20594 peut être cultivée à une température appropriée sur différents milieux nutritifs conventionnels, en culture de surface aérobie ou en culture immergée.

15 Dès qu'une quantité suffisante des nouveaux composés S 41062/F-1, S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7 a été préparée dans la culture, ce que l'on peut déterminer en vérifiant l'activité envers *Candida* sp., le mycélium peut être séparé de la bouillie de culture et extrait
20 en procédant selon les méthodes habituelles.

Selon un procédé d'isolement préféré, on homogénéise le mycélium avec du méthanol, on sépare la phase liquide puis on la concentre. On extrait ensuite avec un solvant organique non miscible à l'eau, par exemple de
25 l'acétate d'éthyle, on élimine le solvant sous pression réduite, on dissout le résidu d'évaporation dans du méthanol et, après lavage, par exemple avec de l'hexane, on évapore à siccité sous pression réduite.

Les souches S 41062/F-1, S 41062/F-6 et/ou
30 S 41062/F-7 peuvent être isolées et purifiées selon des méthodes connues, par exemple par chromatographie ou séparation à contre-courant.

L'invention concerne également les bouillons de fermentation obtenus pendant la culture des souches
35 *Cryptosporiopsis* produisant S 41062/F-1, S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7.

Les nouveaux composés S 41062/F-1, S 41062/F-6 et S 41062/F-7 se signalent par d'intéressantes propriétés pharmacodynamiques, en particulier par des propriétés antibiotiques. Ils exercent notamment une action inhibitrice sur la croissance des micro-organismes tels que les levures et les champignons, mais sont inactifs envers les bactéries gram-positives et gram-négatives.

Le large spectre d'activité des nouveaux composés envers les levures et champignons est particulièrement remarquable envers différentes souches de Candida pathogènes pour l'homme.

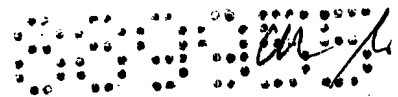
Dans le tableau V suivant, on a rassemblé les concentrations inhibitrices minimales (CIM) de S 41062/F-1, S 41062/F-6, S 41062/F-7 contre différents micro-organismes. Ces concentrations ont été déterminées par des essais de dilution en série, selon des méthodes connues; l'incubation est effectuée à une température de 27°C pendant 48 à 72 heures dans un milieu contenant de l'extrait de malt.

(Tableau V voir page suivante)

T A B L E A U V

5	<u>Organismes</u>	S 41062/F-1	S 41062/F-6	S 41062/F-7
		Concentrations inhibitrices minimales en µg/ml		
10	Candida albicans	0,1	0,3	0,3
	Candida albicans H 12	0,1	0,3	0,3
	Candida albicans 5897	0,1	0,3	0,3
	Candida albicans 439	0,1	0,3	0,1
	Candida albicans 422	0,1	0,3	0,3
	Candida krusei	1	100	100
	Candida tropicalis	10	>100	100
15	Candida tropicalis CK 4	0,3	0,3	0,3
20	Aspergillus niger	>100	>100	>100
	Mucor pusillus	>100	>100	>100
	Trichophyton quinckeanum	>100	>100	>100
	Trichophyton mentagrophytes	1	30	30
	Microsporum canis	> 10	10	10
	Epidermophyton floccosum	-	-	-
	Blastomyces brasiliensis	30	30	10
25				

L'activité inhibitrice envers les levures et les champignons exercée par les nouveaux composés a également été mise en évidence par des essais in vivo sur le modèle d'infection génitale. On infeste par voie intra-vaginale des souris et des rats préalablement traités avec du benzoate d'estradiol, puis on les traite pendant 5 jours successifs, par voie orale ou parentérale (souris) ou par voie intra-vaginale (rat) avec la substance



à essayer. Le résultat du traitement est déterminé par la présence ou l'absence de champignon dans le vagin ou sur l'utérus de ces animaux.

On observe une activité anti-mycotique
5 en application topique à une concentration de 2% et au delà.

L'activité systémique est observée in vivo lors de l'application sous-cutanée à une dose comprise environ entre 5 et 50 mg/kg.

10 Grâce à ces propriétés, les composés S 41062/F-1, S 41062/F-6 et S 41062/F-7 peuvent être utilisés en thérapeutique comme médicaments, en particulier comme antibiotiques. Ils seront prescrits à une dose quotidienne comprise entre environ 300 et 3000 mg, qu'on administrera
15 en plusieurs doses unitaires contenant chacune environ de 75 à 1500 mg de substance active, à raison de 2 à 4 fois par jour, ou sous forme retard.

Les nouveaux antibiotiques de l'invention peuvent être utilisés soit seuls soit mis sous forme de compositions pharmaceutiques appropriées, notamment pour l'administration
20 par voie orale ou parentérale. Pour préparer des compositions pharmaceutiques appropriées, on travaille la substance active avec des véhicules, diluants et/ou excipients acceptables du point de vue pharmacologique. De telles
25 compositions font partie de l'invention.

Les exemples suivants illustrent la présente invention sans aucunement en limiter la portée. Les températures sont toutes indiquées en degrés Celsius.

Exemple 1

30 Culture de la souche ATCC 20594 dans un fermenteur en verre

a) Culture initiale sur milieu gélosé

La suspension de spores et de mycélium utilisée pour ensemercer est préparée à partir d'une culture inclinée de souches ATCC 20594 obtenue après 21 jours
35 d'incubation à 21° sur un milieu gélosé ayant la composition suivante :



Extrait de malt (sirop)	20 g
Extrait de levure	4 g
Agar-Agar	20 g et
Eau déminéralisée	q.s.p. 1 litre

5 b) Préculture

On met en suspension dans une solution physiologique de chlorure de sodium, les spores et les mycéliums de la culture obtenue sous a) et on utilise cette suspension pour ensemer dans un Erlenmeyer de 2 litres, 1 litre du milieu de préculture suivant :

Extrait de malt (sirop)	20 g
Extrait de levure	4 g
Eau déminéralisée	q.s.p. 1 litre

On laisse incuber pendant 7 jours à 21°, sur un agitateur à mouvement rotatif, tournant à 180 tours/minute.

c) Culture productive

On utilise la préculture obtenue sous b) pour ensemer, dans un fermenteur en verre de 14 litres, 10 litres du milieu de culture suivant :

Extrait de malt (liquide)	20 g
Extrait de levure	4 g
Acide citrique	12 g
Hydroxyde de sodium 1N	112 ml
Acide chlorhydrique 1N	44 ml
Eau déminéralisée	q.s.p. 1 litre

Avant de procéder à la stérilisation, on ajuste le pH à 3,8-4,1, par addition d'un mélange d'acide chlorhydrique 1N et d'hydroxyde de sodium 1N.

On laisse incuber pendant 5 jours à 21° tout en agitant à 150 tours/minute et sous aération (1 litre/minute/litre de milieu).

Exemple 2

Culture de la souche ATCC 20594 dans un fermenteur en acier

a) Culture de départ sur milieu gélosé

On effectue la culture pendant 21 jours à 21° dans des ballons de Roux de 400 ml, en utilisant 150 ml du même milieu gélosé que celui décrit à l'exemple la).

5 b) Préculture

Pour préparer la suspension nécessaire pour l'ensemencement, on ajoute 50 ml d'une solution saline physiologique et on obtient la suspension de spores et de mycélium en utilisant un racloir stérile.

10 On utilise les 250 ml d'inoculum ainsi préparé pour ensemen- cer 50 litres d'un milieu de préculture de la même composition que celle décrite à l'exemple lb). On opère dans un fermenteur en acier de 75 litres.

15 On laisse incubé pendant 5 jours à 21° sous une pression de 0,5 bar tout en aérant (0,5 litre d'air par minute), et en agitant à une vitesse de rotation de 150 tours/minute.

c) Culture intermédiaire

20 On utilise 100 litres de la préculture décrite ci-dessus pour ensemen- cer 500 litres du milieu de culture intermédiaire ayant la composition suivante :

Extrait de malt (sirop)	50 g
Extrait de levure	10 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	16,68 mg
25 ZnSO ₄ , 7H ₂ O	6,88 mg
Eau déminéralisée	q.s.p. 1 litre

30 On opère dans un fermenteur en acier de 750 litres. On laisse incubé pendant 4 jours à 21° sous une pression de 0,5 bar tout en aérant (0,5 litre par minute, par litre de milieu nutritif), et en agitant (100 rotations par minute),

d) Culture principale

35 On utilise la culture intermédiaire pour ensemen- cer dans un fermenteur en acier de 4500 litres, 3000 litres d'un milieu nutritif d'une composition identique à celle décrite sous lc). On laisse incubé

pendant 5 jours à 21°, sous une pression de 0,5 bar tout en aérant à raison de 1,0 litre par minute et par litre de milieu nutritif.

Exemple 3

5 Isolement des composés S 41062/F-1, S 41062/F-6 et S 41062/F-7

On ajuste à pH 6-7, 300 litres du bouillon de fermentation (obtenu à l'exemple 2) par addition d'acide sulfurique dilué ou d'hydroxyde de sodium
10 et on sépare le précipité de mycélium du filtrat de culture à l'aide d'un séparateur Westfalia.

On homogénéise le mycélium humide dans un réacteur Dispax avec 10 fois sa quantité de méthanol et on sépare la phase liquide. On répète cette opération
15 à deux reprises avec du méthanol aqueux à 90%. Après avoir réuni les filtrats, on élimine le méthanol sous pression réduite et on extrait à 3 reprises avec de l'acétate d'éthyle et une fois avec un mélange d'acétate d'éthyle et d'isopropanol dans le rapport 4:1. On élimine
20 ensuite les solvants sous pression réduite et on dissout le résidu dans 10 fois sa quantité de méthanol aqueux à 90%. Après lavage avec de l'hexane, la phase polaire est évaporée à siccité sous pression réduite.

On dissout ce résidu dans 1,5 litre d'un
25 mélange de chlorure de méthylène, de méthanol et d'eau dans le rapport 78:20:2 et on le sépare par chromatographie sur 20 kg de gel de silice Merck (0,05 - 0,2 mm) en utilisant le même mélange de solvants comme éluant. On obtient des fractions de 13 litres.

30 On réunit les fractions n° 8 et 9 qui sont actives contre Candida albicans; elles contiennent principalement les composés S 41062/F-1 et S 41062/F-7. On chromatographie ces fractions sur 1,5 kg de Séphadex LH 20 en éluant avec du méthanol
35 (fractions de 25 ml). Les fractions 42 à 62 sont considérablement enrichies en S 41062/F-1 et S 41062/F-7.

On divise les résidus concentrés de ces fractions en 4 portions qui sont chacune chromatographiées sur 1,2 kg de gel de silice H Merck (dans des colonnes de 10 cm de diamètre). On utilise, comme éluant, un mélange de chlorure de méthylène et de méthanol dans le rapport 4:1 et on recueille des fractions de 100 ml.

On vérifie la pureté des résidus des fractions par chromatographie en couche mince et on réunit les fractions pures. Les fractions 40 à 65 contiennent S 41062/F-7 à l'état pur et les fractions 75 à 85 comprennent S 41062/F-1 à l'état pur.

On dissout dans l'éthanol les résidus concentrés contenant S 41062/F-1, on réunit les solutions, on traite la solution globale avec du charbon actif et on filtre sur une couche de talc de manière à obtenir une solution limpide. Après avoir évaporé le filtrat presque incolore sous pression réduite ménagée, on mélange lentement le résidu avec de l'acétone, ce qui fait précipiter le S 41062/F-1 sous la forme d'un produit blanc, microcristallisé et, mouillé de solvant, fortement hygroscopique. Il fond à 235-240° avec décomposition graduelle.

On réunit ensuite les fractions contenant uniquement S 41062/F-7 comme mis en évidence par chromatographie en couches minces, on filtre dans du méthanol sur une couche de talc et, après avoir concentré sous pression réduite, on ajoute lentement de l'acétone. On obtient ainsi S 41062/F-7 sous la forme d'un précipité amorphe fondant à partir de 205°C (suintement avec décomposition graduelle).

On réunit les fractions 10 et 11 qui ont été obtenues lors de la première chromatographie et qui contiennent principalement S 41062/F-6. On chromatographie la solution globale résultante sur 500 g de gel de silice Merck (0,04-0,06 mm) en utilisant, comme éluant, un mélange de chlorure de méthylène et de méthanol dans le

rapport 4:1 et on recueille des fractions de 80 ml.

On évapore à siccité sous pression réduite les fractions présentant une activité contre *Candida albicans* puis on vérifie la pureté des résidus d'évaporation par chromatographie en couche mince.

On réunit les fractions contenant en majeure partie S 41062/F-6, on les dissout dans du méthanol, on filtre sur une couche de talc et, après évaporation sous pression réduite, on mélange lentement avec de l'acétone.

Le composé S 41062/F-6 ainsi obtenu précipite sous la forme d'un composé blanc micro-cristallin fondant à 240-244° avec décomposition graduelle.

REVENDEICATIONS

1.- Nouveaux antibiotiques S 41062/F-1,
S 41062/F-6 et S 41062/F-7, caractérisés en ce que

a) l'antibiotique S 41062/F-1 présente les caractéris-

5 tiques suivantes :

poudre microcristalline blanche ;

$$[\alpha]_D^{20} = -6^\circ \quad (c = 0,5 \text{ dans le méthanol}) ;$$

analyse élémentaire :

C = 55,7%; H = 7,7%; N = 10,1%; O = 24,7%;

10 spectre infrarouge dans le bromure de potassium :

voir figure 1;

spectre RMN sur protons (90 MHz dans le diméthylsulfoxyde; substance de référence : tétraméthylsilane):

voir figure 4;

15 spectre ultraviolet dans le méthanol :

$$\lambda_{\max} \text{ 193 nm } E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 786$$

(222) nm " = 140

279 nm " = 14;

activité antibiotique : voir tableau V;

20 poids moléculaire : 1048 ;

b) l'antibiotique S 41062/F-6 présente les caractéristiques suivantes :

poudre microcristalline blanche ;

$$[\alpha]_D^{20} = -9^\circ \quad (c = 0,5 \text{ dans le méthanol});$$

analyse élémentaire :

C = 56,3% H = 7,7% N = 10,9% O = 26,0%;

spectre infrarouge dans le bromure de potassium :

voir figure 2 ;

30 spectre RMN sur protons (90 MHz dans le diméthyl-

sulfoxyde; substance de référence : tétraméthylsilane):

voir figure 5 ;

spectre ultraviolet dans le méthanol :

$$\lambda_{\text{max}} \text{ 193 nm} \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} = 861$$
$$35 \quad (222)_{nm} \quad \therefore \frac{1cm}{\lambda} = 340$$
$$(222) \text{ nm} \therefore " = 340$$

278 nm " = 15 ;

activité antibiotique : voir tableau V; et

c) l'antibiotique S 41062/F-7 présente les caractéristiques suivantes :

poudre blanche ;

5 $[\alpha]_D^{20} = -6$ (c = 0,5 dans le méthanol) ;

analyse élémentaire :

C = 54,5% H = 7,5% N = 9,9% O = 25,0% ;

spectre infrarouge dans le bromure de potassium :

voir figure 3 ;

10 spectre RMN sur protons (90 MHz dans le diméthylsulfoxyde; substance de référence : tétraméthylsilane): voir figure 6 ;

spectre ultraviolet dans le méthanol :

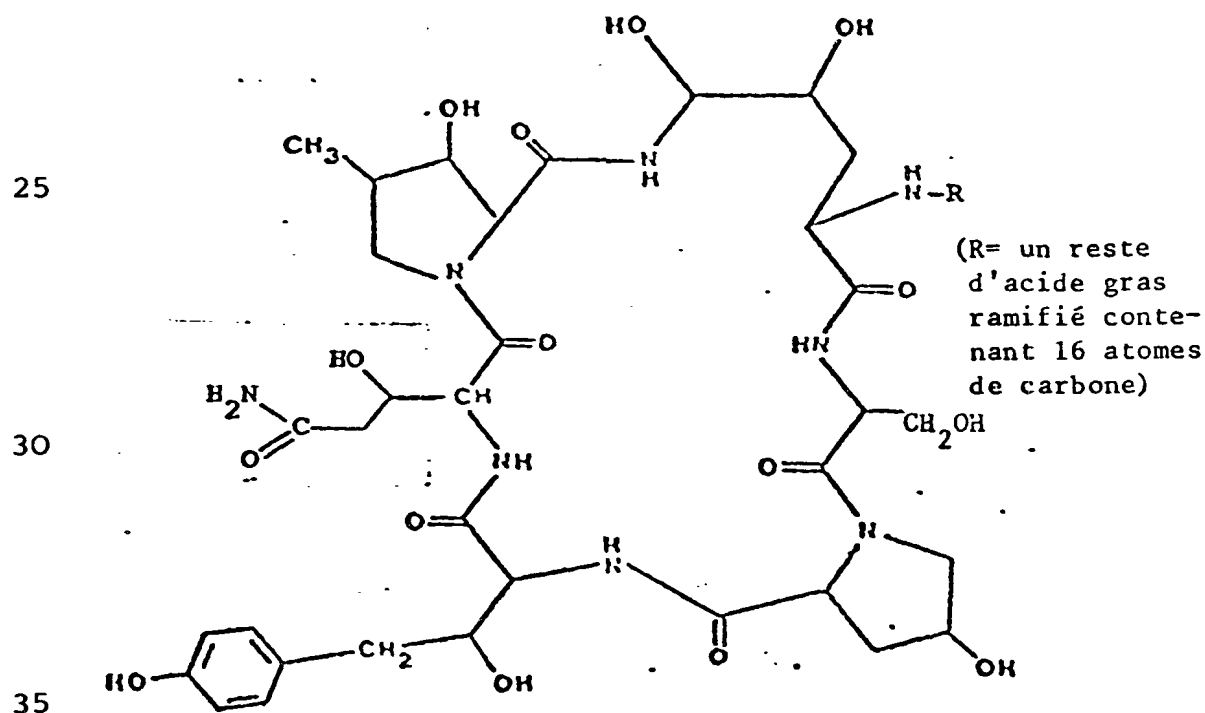
15 $\lambda_{\max} 194 \text{ nm}$ $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 890$

(222) nm " = 339

278 nm " = 15 ;

activité antibiotique voir tableau V .

2.- Nouvel antibiotique S 41062/F-1, caracté-
20 risé en ce qu'il répond à la formule



3.- L'antibiotique S 41062/F-1 tel que défini à la revendication 1 ou 2.

4.- L'antibiotique S 41062/F-6 tel que défini à la revendication 1.

5 5.- L'antibiotique S 41062/F-7 tel que défini à la revendication 1.

6.- Un procédé de préparation des nouveaux composés S 41062/F-1 et/ou S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7 spécifiés à la revendication 1, caractérisé en ce qu'on
10 cultive sur ou dans un milieu nutritif une souche susceptible de produire les composés S 41062/F-1 et/ou S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7, puis on isole S 41062/F-1 et/ou S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7 ainsi obtenus.

7.- Un procédé selon la revendication 6, caracté-
15 risé en ce qu'on utilise une souche du genre Cryptosporiopsis.

8.- Un procédé selon l'une quelconque des revendications 6 et 7, caractérisé en ce qu'on utilise, comme souche, la souche NRRL 12 192 ou ATCC 20594.

20 9.- L'application en thérapeutique des nouveaux composés S 41062/F-1, S 41062/F-6 et S 41062/F-7 spécifiés à l'une quelconque des revendications 1 à 5, à titre de principes actifs de médicaments.

10.- Un médicament, caractérisé en ce qu'il
25 contient, à titre de principe actif, le nouvel antibiotique S 41062/F-1 spécifié à l'une quelconque des revendications 1 ou 2.

11.- Un médicament, caractérisé en ce qu'il
30 contient, à titre de principe actif, le nouvel antibiotique S 41062/F-6 spécifié à la revendication 1.

12.- Un médicament, caractérisé en ce qu'il
contient, à titre de principe actif, le nouvel anti-
biotique S 41062/F-7 spécifié à la revendication 1.

000000

13.- Une composition pharmaceutique, caractérisée
en ce qu'elle contient un composé tel
que spécifié à l'une quelconque des revendications
1 à 5, en association avec des excipients et véhicules
5 acceptables du point de vue pharmaceutique.

14.- Un bouillon de fermentation, caractérisé
en ce qu'il est obtenu par culture d'une souche
susceptible de produire les composés S 41062/F-1
et/ou S 41062/F-6 et/ou S 41062/F-7 spécifiés à la
10 revendication 1.

15.- Un bouillon de fermentation selon la
revendication 14, caractérisé en ce qu'il est
obtenu par culture de la souche NRRL 12192 ou ATCC 20594.

16.- La souche NRRL 12 192 ou ATCC 20 594.

15 17.- Produits et procédés en substance comme
ci-dessus décrit avec référence aux exemples cités.

11 août 1981

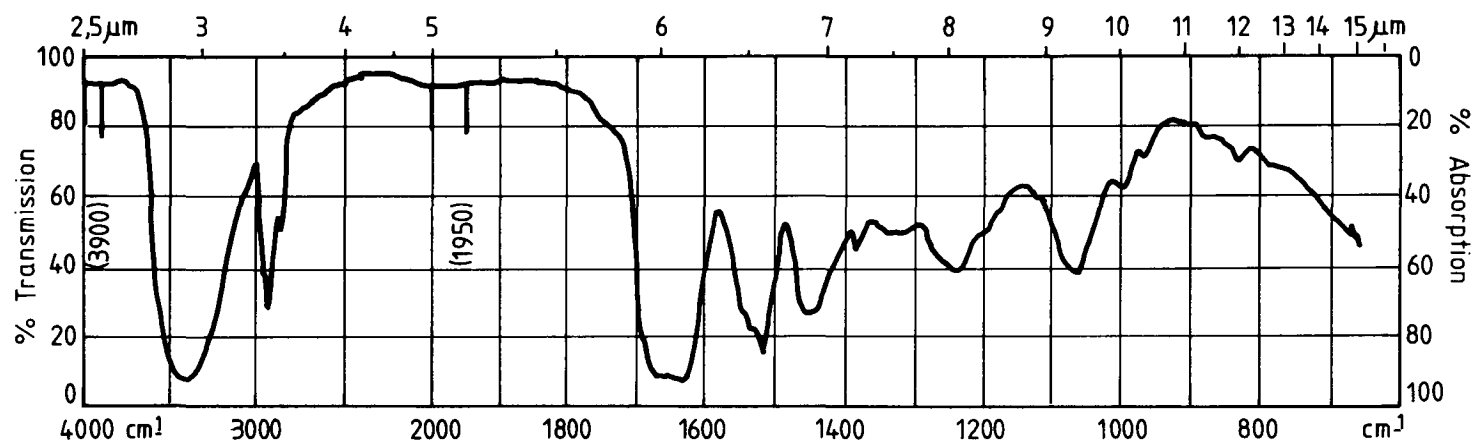
William H. Lewis

000000

S A N D O Z · S.A.

I

FIG. 1



11 août 1981

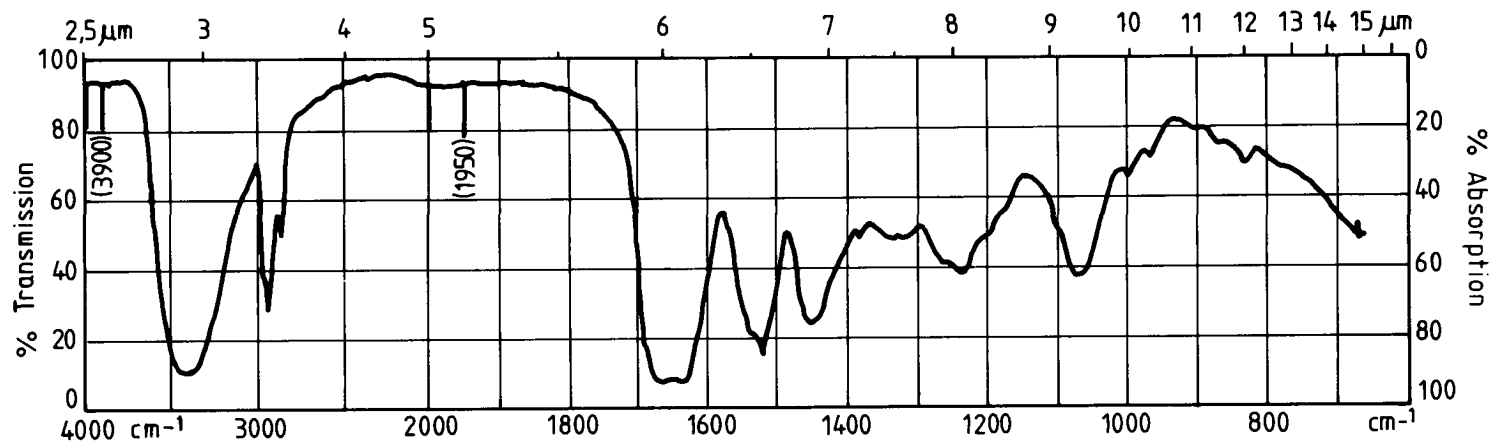
Gulling il. lies

000000

S A N D O Z S.A.

2

FIG. 2



11 août 1981

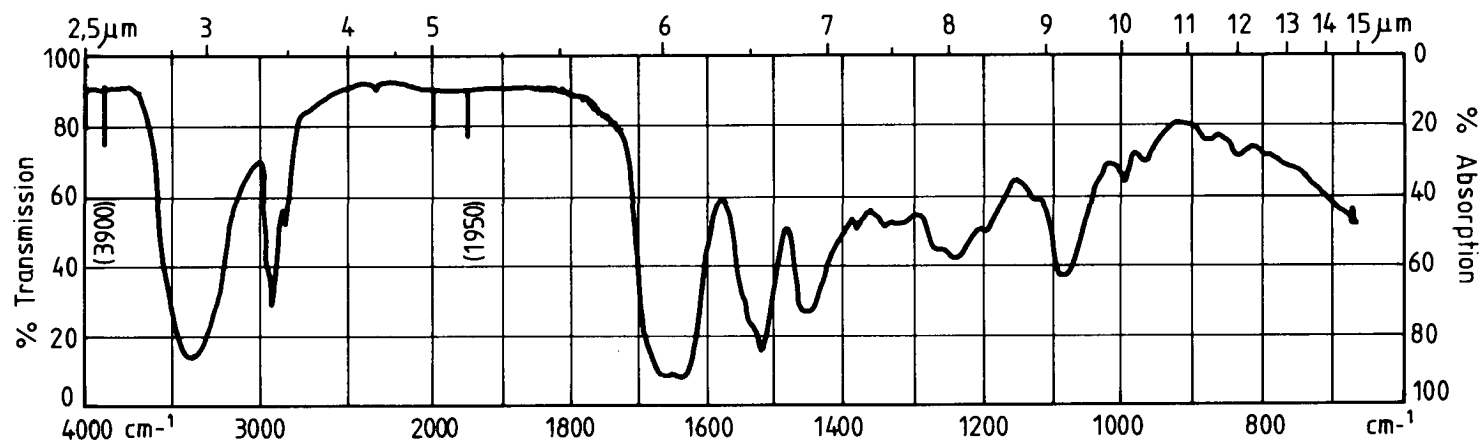
Polkingh. / 12.4.81

000055

S A N D O Z S.A.

3

FIG. 3



11 août 1981

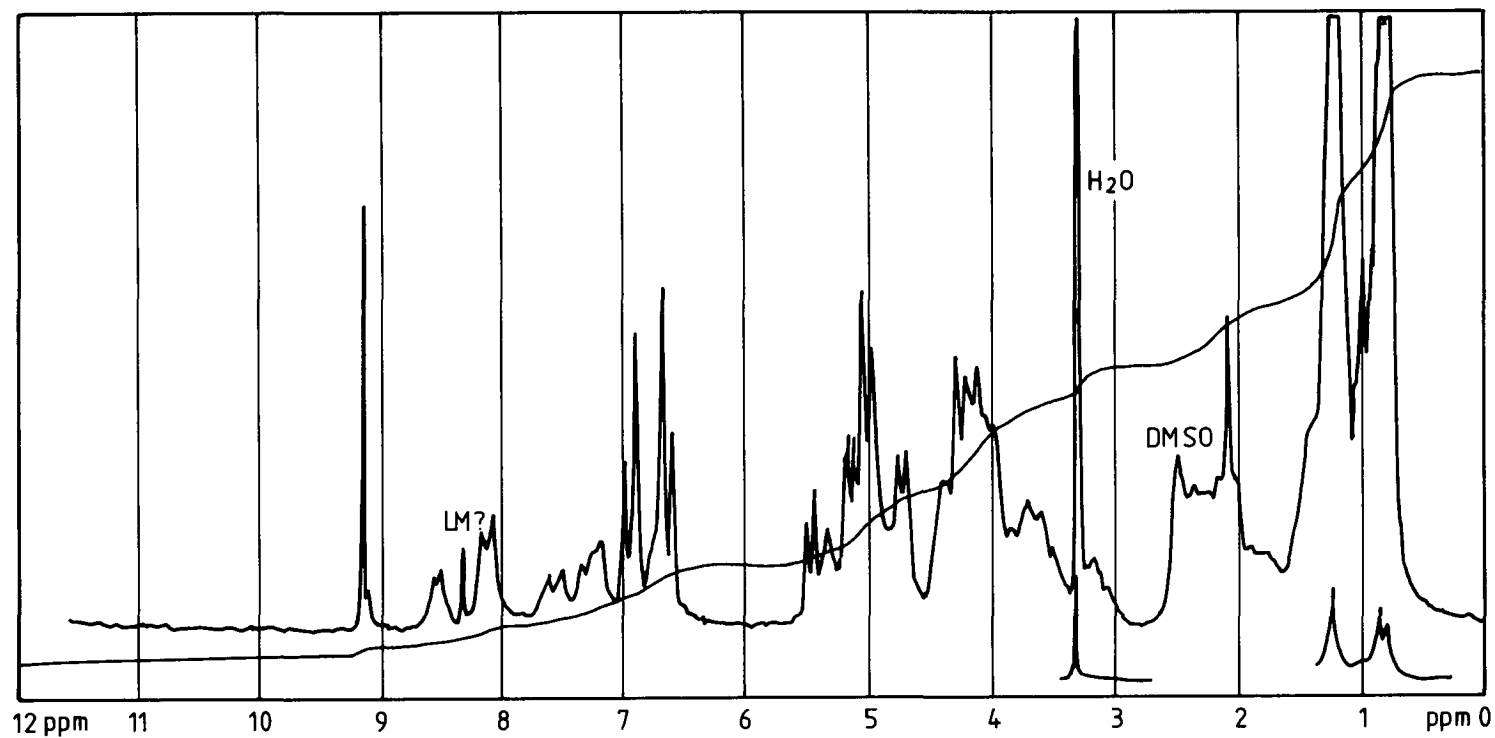
P. Gullin - il. piece

000000

S A N D O Z S.A.

4

FIG. 4



11 août 1981

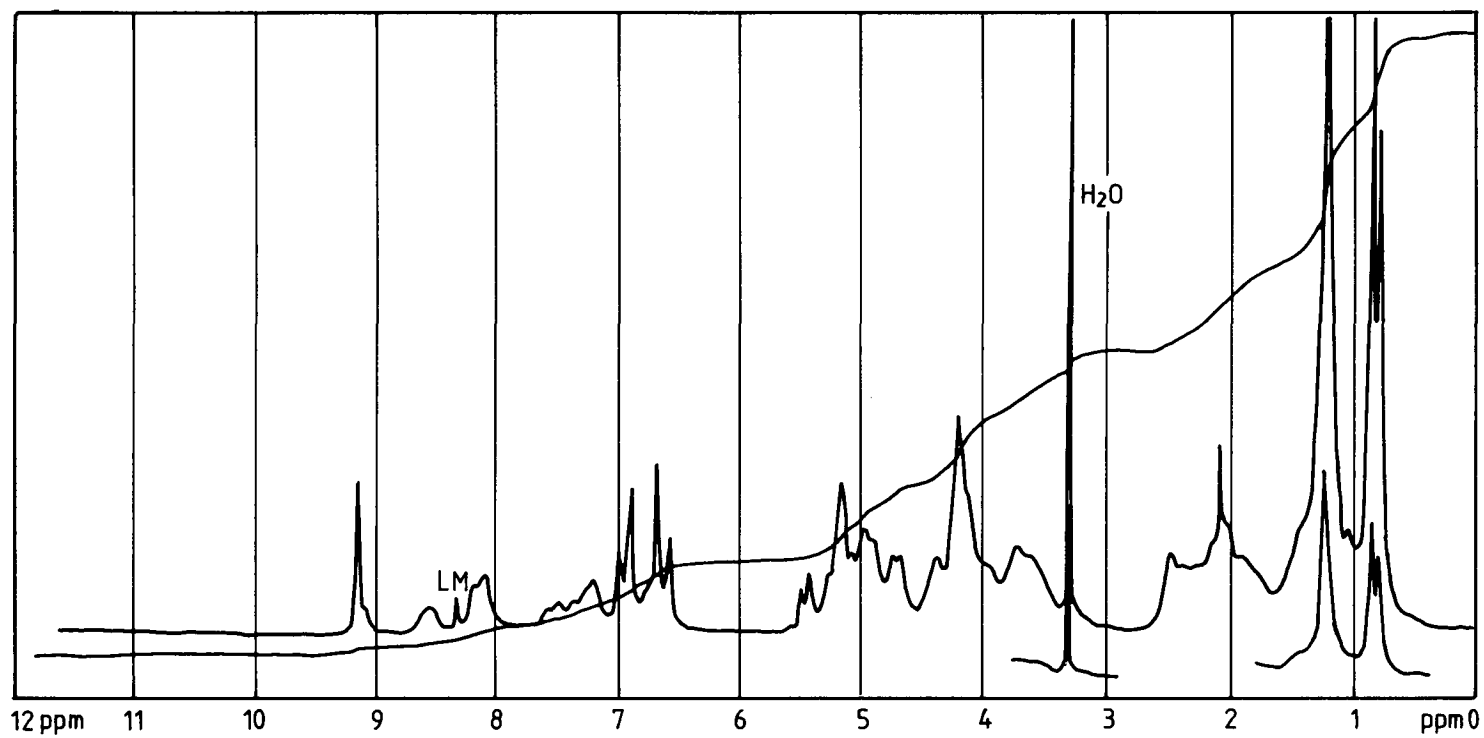
Selling i.i. piece

000055

S A N D O Z S.A.

5

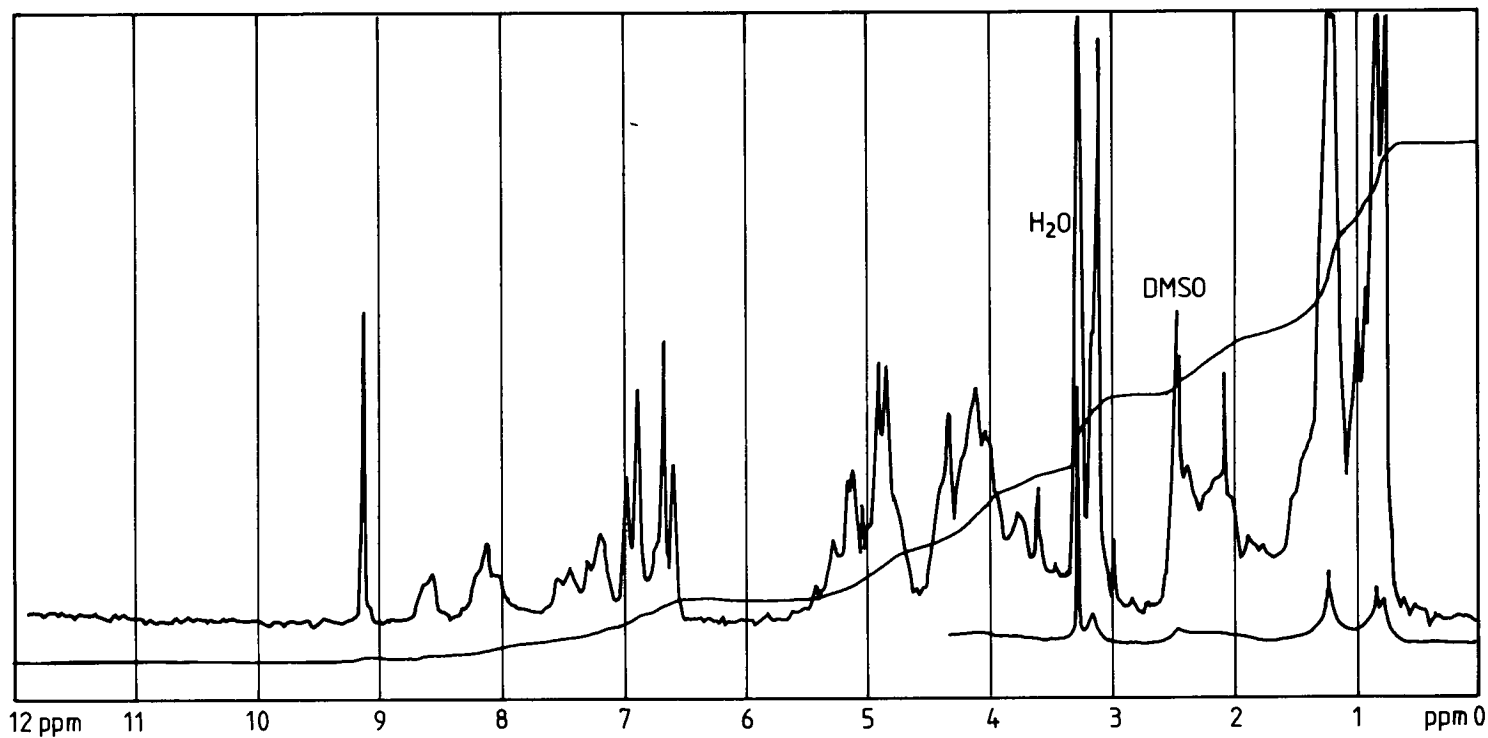
FIG. 5



11 août 1981

P. Gilling i.r. belis

FIG. 6



11 août 1981

Gullin i. lictis