

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 547 594

②1 N° d'enregistrement national :

84 07477

⑤1 Int Cl³ : C 12 P 1/06; A 61 K 31/71; C 07 G 11/00;
C 12 N 1/20 // C 12 R 1/03.

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15 mai 1984.

③0 Priorité : US, 16 mai 1983, n° 495 231.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 51 du 21 décembre 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *BRISTOL-MYERS COMPANY.* — US.

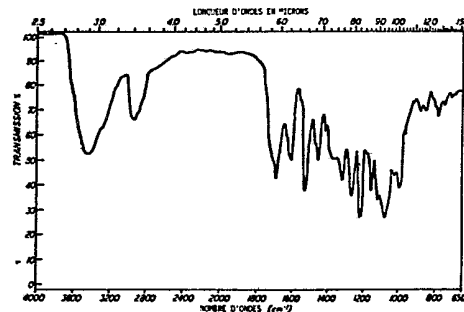
⑦2 Inventeur(s) : Masataka Konishi, Kyoichiro Saitoh, Hi-
roaki Ohkuma et Hiroshi Kawaguchi.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Marc-Roger Hirsch.

⑤4 Nouveaux complexes antitumoraux antibiotiques et leur procédé de production par culture d'une souche d'*Actinoma-
dura verrucosospora*.

⑤7 Nouveaux complexes antibiotiques appelés BBM-1675
produits par fermentation d'une nouvelle souche d'*Actinoma-
dura verrucosospora*. Le complexe peut être séparé en deux
constituants majeurs BBM-1675 A₁ et A₂ et quatre consti-
tuants mineurs BBM-1675 A₃, A₄, B₁ et B₂ et ces constituants
présentent simultanément une activité antitumorale et une
activité antimicrobienne.



FR 2 547 594 - A1

D

~~NOUVEAUX COMPLEXES ANTITUMORAUX ANTIBIOTIQUES~~

L'invention a pour objet de nouvelles substances anti-tumorales à propriétés antibiotiques et se rapporte à leur production et à leur
5 séparation.

Les composés antibiotiques antitumoraux selon la présente invention n'ont pas jusqu'à présent été identifiés en terme de structure. Du fait de leurs propriétés physique, chimique et biologique spécifiques cependant, la demanderesse pense que les antibiotiques BBM-1675 selon la
10 présente invention sont des substances nouvelles.

La demande de brevet européen n° 951 54A1 décrit la fermentation des *Actinomadura pulveraceus* sp. (nov. n° 6049, ATCC 39100) pour produire des antibiotiques antitumoraux qu'elle appelle WA 6049-A et WS 6049-B. Les structures des antibiotiques WS 6049 n'ont pas été détermi-
15 nées jusqu'à présent mais les propriétés antibiotiques qui les caractérisent indiquent que WS 6049-A et WS 6049-B sont apparentés quant à leur structure aux antibiotiques BBM-1675 selon la présente invention. Les données spectrales montrent, cependant, que ni la WS 6049-A, ni la WS 6049-B sont identiques à un des composés BBM-1675 selon l'invention.
20 De plus, l'organisme producteur décrit dans la demande de brevet européen publié sous le numéro 95154A1 peut se distinguer totalement de l'*Actinomadura verrucosospora* employé conformément à la présente invention quant à la couleur du mycelium aérien obtenu sur milieu ISP nos. 2, 3 et 4, quant à la peptonisation lactique positive et quant à son utilisation positive des D-fructose, D-mannitol, tréhalose et cellulose.
25

La présente invention a pour objet un nouveau complexe antibiotique antitumoral, appelé dans la présente BBM-1675, ce complexe étant produit par culture d'une souche d'*Actinomadura verrucosospora* productrice de BBM-1675, plus particulièrement de la souche *Actinomadura verrucosospora* H 964-92 (ATCC 39334) ou de la souche *Actinomadura verrucosospora*
30 A 1327Y (ATCC 39638) ou d'un de ses mutants, dans un milieu aqueux nutri-

tif contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, dans des conditions aérobies submergées jusqu'à ce qu'une quantité substantielle dudit complexe BBM-1675 soit produite par ledit organisme dans ledit milieu de culture et éventuellement par sa récupération du milieu de culture.

La présente invention a également pour objet deux constituants bioactifs majeurs du complexe BBM-1675 appelés BBM-1675 A₁ et BBM-1675 A₂ et quatre constituants bioactifs mineurs dudit complexe appelés BBM-1675 A₃, A₄, B₁ et B₂. Les constituants peuvent être séparés et purifiés par des procédures de chromatographie classiques. La BBM-1675 complexe et ses constituants bioactifs présentent à la fois une activité antimicrobienne et une activité antitumorale.

D'autres buts et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la description suivante et des dessins donnés à titre non limitatif.

- la figure 1 présente le spectre d'absorption infrarouge de BBM-1675 A₁ partiellement purifié (pellet KBr);
- la figure 2 présente le spectre d'absorption infrarouge de BBM-1675 A₂ partiellement purifié (pellet KBr);
- la figure 3 présente le spectre d'absorption infrarouge de BBM-1675 A₃ (pellet KBr);
- la figure 4 montre le spectre d'absorption infrarouge de BBM-1675 A₄ (pellet KBr);
- la figure 5 présente le spectre de résonance magnétique protonique de BBM-1675 A₁ partiellement purifié dans CDCl₃ (60 MHz);
- la figure 6 présente le spectre de résonance magnétique protonique de BBM-1675 A₂ partiellement purifié dans CDCl₃ (60 MHz);
- la figure 7 présente le spectre de résonance magnétique protonique de BBM-1675 A₃ dans CDCl₃ (60 MHz);
- la figure 8 présente le spectre de résonance magnétique protonique de BBM-1675 A₄ dans CDCl₃ (60 MHz);
- la figure 9 présente le spectre d'absorption infrarouge de BBM-1675 A₁ purifié (pellet KBr);
- la figure 10 présente le spectre de résonance magnétique protonique de BBM-1675 A₁ purifié dans CDCl₃ (360 MHz);
- la figure 11 présente le spectre de résonance magnétique dans le

carbone ^{13}C de BBM-1675 A₁ purifié dans CDCl_3 (90,3 MHz);

- la figure 12 présente le spectre d'absorption infrarouge de BBM-1675 A₂ purifié (pellet KBr);
- 5 - la figure 13 présente le spectre de résonance magnétique protonique de BBM-1675 A₂ purifié dans CDCl_3 (360 MHz);
- la figure 14 présente le spectre de résonance magnétique dans ^{13}C de BBM-1675 A₂ purifié dans CDCl_3 (90,3 MHz).

L'invention a pour objet un nouveau complexe antibiotique anti-
 10 tumoral appelé dans la présente BBM-1675 et se rapporte également à sa préparation par fermentation de certaines souches d'*Actinomadura verrucospora*, et plus particulièrement de la souche *Actinomadura verrucospora* H 964-92 et d'un de ses mutants appelés souche *Actinomadura Verrucospora* A1327Y. La souche parente précitée est isolée d'un échantillon de
 15 sol recueilli à Pto Esperanza, Misiones, Argentine. Une culture biologiquement pure de l'organisme a été déposée dans la collection américaine dite American Type Culture Collection, Washington, D.C. et ajoutée à sa collection permanente de micro-organismes sous le numéro de collection ATCC 39334. Ultérieurement, la souche de mutant A1327Y a été obtenue par
 20 traitement classique à la nitrosoguanidine (NTG) de la souche H 964-92 et a été également déposée dans la collection précitée American Type Culture Collection sous le numéro de référence ATCC 39638.

Comme dans le cas de nombreuses cultures productrices d'antibiotiques, la fermentation de la souche *Actinomadura Verrucospora* H 964-92
 25 ou de la souche A1327Y conduit à la production d'un mélange ou d'un complexe formé de substances constitutives. Deux constituants bioactifs majeurs, BBM-1675 A₁ et A₂ et quatre constituants bioactifs mineurs BBM-1675 A₃, A₄, B₁ et B₂ ont été séparés à partir du complexe BBM-1675 produit durant le procédé de fermentation.

30 La BBM-1675 et ses constituants BBM-1675 A₁, A₂, A₃, A₄, B₁ et B₂ présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis d'un large spectre de micro-organismes y compris des bactéries gram-positif. Le complexe BBM-1675 et ses constituants bioactifs distincts présentent également des propriétés inductrices de phage dans les bactéries lysogènes. Deux
 35 des constituants, à savoir BBM-1675 A₁ et BBM-1675 A₂, ont été soumis à des tests de détermination in vivo sur divers systèmes de tumeurs de souris et démontrent une activité inhibitrice vis-à-vis de la leucémie L-1210, de la leucémie P-388, des mélanomes B16 et des carcinomes du

poumon de Lewis. La BBM-1675 A₃ et la BBM-1675 A₄ ont montré une activité vis-à-vis de la leucémie P-388 de la souris. Le complexe et ses constituants bioactifs, par conséquent, peuvent être utilisés en tant qu'agents antimicrobiens ou en tant qu'agents antitumoraux pour inhiber des tumeurs
5 chez des mammifères.

Le micro-organisme

La souche actinomycète H 964-92 a été isolée à partir d'un échantillon de sol et par des procédures classiques mise sous la forme de culture biologiquement pure pour sa caractérisation. La souche H 974-92
10 comporte sur le mycelium aérien des courtes chaînes de spores qui ont des formes allongées, tortueuses ou en forme de crochet. Les spores ont une forme ovale ou sphérique et présentent une surface verruqueuse. Le mycelium aérien se forme faiblement sur la plupart des milieux. La couleur de la masse aérienne est blanche et ultérieurement elle passe à une
15 coloration dans les violets ou voit sa couleur changer en une couleur bleuâtre dans certains milieux comprenant de l'agar. La couleur du mycélium formant le substrat est incolore ou légèrement rose. La température de croissance est comprise entre 15°C et 43°C. La composition en amino-acide de la paroi des cellules et les constituants sucres des hydrolysats
20 de la totalité de la cellule montrent que la souche H 964-92 appartient au type III_B de paroi cellulaire. La ménaquinone a été identifiée en tant que MK-9(H₆).MK-9(H₈).

Sur la base des caractéristiques morphologiques, culturelles et physiologiques majeures ainsi que des caractéristiques de composition
25 chimique de la paroi cellulaire, on peut classer la souche H 964-92 dans le genre Actinomadura.

Quoique la souche originale H 964-92 ne donne lieu qu'à une croissance modérée et à un mycelium aérien clairsemé, une variante montrant une bonne croissance et une formation de mycelium aérien améliorée
30 consiste en un traitement de H 964-92 à la nitrosoguanidine (NTG) . La variante, appelée souche A1327Y, rend plus aisée l'investigation taxonomique et a été par conséquent en tant qu'Actinomadura Verrucosopora.

Méthode

Les milieux et les procédures utilisés pour l'examen des caractéristiques de culture et l'utilisation des hydrates de carbone sont celles
35 recommandées par International Streptomyces Project (Intl. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340, 1966). Le milieu additionnel décrit par S.A. Waksman (The Actinomycetes, vol. 2) et G.M. Lvedemann (Intl. J. Syst. Bacteriol. 21: 240-247, 1971) a été également utilisé.

La composition en amino acide de la paroi cellulaire et les constituants sucres de l'hydrolysate de la cellule sont analysés conformément aux méthodes décrites par Becker et coll. dans Appl. Microbiol. 13: 236-243, 1965 et par Lechevalier et Lechevalier dans Actinomycetes, Ed. H. Prauser, 5 Jena, Gustav Fischer Verlag, pages 393-405, 1970, respectivement. La ménaquinone a été identifiée par l'analyse spectrale de masse conformément aux procédés de Collins et coll. dans J. Gen. Microbiol. 100: 221-230, 1977, et la composition de la ménaquinone est représentée sur la base du système décrit par Yamada et coll. dans J. Gen. Appl. Micro- 10 biol. 23: 331-335, 1977.

Morphologie

La souche H 964-92 forme à la fois un substrat et un mycelium aérien. Le mycélium du substrat est long, ramifié et n'est pas fragmenté en petits filaments. Dans le mycélium aérien se forment des chaînes de 15 spores courtes, monopodes ou à extrémités hyphale. Des branches ayant la forme de verticilles ou de chaîne de spores sont également observées à proximité de l'extrémité hyphale. Ces chaînes de spores contiennent de deux à dix spores par chaîne et ont une forme droite, flexueuse ou tortueuse. Les spores présentent une surface verruqueuse et ont une 20 forme comprise entre la forme sphérique et la forme elliptique (0,5-0,6 x 0,6-1,4 μm) avec des extrémités pointues ou arrondies. Après maturation, chaque spore est souvent obtenu avec une feuille vide. Des spores, sporanges ou granules sclérotiques mobiles n'ont été trouvés dans aucun des milieux examinés.

25 Caractéristiques physiologiques et de culture

La croissance de la souche H 964-92 est de faible à modérée aussi bien dans les milieux organiques naturels que dans les milieux chimiques définis. La formation du mycelium aérien est en général faible mais est modérée dans l'agar de farine d'avoine (milieu ISP n° 3), dans l'agar 30 d'amidon+sels minéraux (milieu ISP n° 4) et dans l'agar de Bennett. Des variantes spontanées qui manquent de mycelium aérien se produisent aux fréquences élevées. La couleur du mycelium aérien est blanc et ultérieurement il devient rose pâle dans l'agar de farine d'avoine, l'agar d'amidon+sels minéraux et l'agar d'asparagine+glycérol (milieu ISP n°5). 35 La couleur de la masse aérienne change ultérieurement pour passer à une couleur bleuâtre après une longue période d'incubation (5 mois) dans l'agar de farine d'avoine, l'agar d'asparagine+glycérol et l'agar de tyrosine. La couleur du mycélium de substrat est incolore à jaune dans

l'agar de Czapek, l'agar de tyrosine, l'agar d'extrait de malt+ extrait de levure (milieu ISP n° 2), l'agar de fer+extrait de levure+peptone (milieu ISP n° 6) et l'agar de Bennett et est de couleur violette dans l'agar d'asparagine+glycone et l'agar d'asparagine+glycérol. Des méla-
 5 noïdes et autres pigments diffusibles ne sont pas produits. Une variante n° A1327Y, qui a été obtenue à partir de la souche originale, forme de façon prédominante un mycélium aérien bleu pâle et porte une masse de spores aériennes abondante.

La souche H 964-92 se développe à 15°C, 28°C, 37°C et 43°C, mais
 10 ne se développe pas à 10°C ou à 47°C. Elle est sensible à NaCl à 7%, et résistante à la lysozyme à 0,01%.

Les caractéristiques physiologiques et de cultures de la souche productrice sont consignées dans les tableaux 1 et 2 respectivement. L'utilisation de sources de carbone est montrée dans le tableau 3.

15

TABLEAU 1

Caractéristiques de culture de la souche H 964-92
(souche originale ATCC 39334 et mutant A 1327Y)

	<u>Souche n° H 964-92</u>		
	<u>souche originale</u> <u>(ATCC 39334)</u>	<u>Mutant</u> <u>n° A1327Y</u>	<u>Actinomadura</u> <u>Verrucosospora</u> <u>KCC A-0147</u>
20	agar extrait de levure +tryptone (ISP n° 1)	G. abondant, floccose, sédimenté et non pigmenté	modéré, floccose, sédimenté et non pigmenté
25	agar de nitrate+sucrose (agar de Czapek)	G. modéré R. incolore A. rare, gris clair (264), à rose pâle (7) D. rien	faible incolore rien ou rare; blanc rosâtre (9) rien
30	agar d'asparagine+glucose	G. modéré R. blanc (263) à rose jaunâtre profond A. rien ou très rare; rose pâle (7) D. rien	faible incolore rien ou très rare; blanc rien
35	agar d'asparagine+glycérol (ISP n° 5)	G. faible à modéré R. incolore à rose jaunâtre clair A. faible; rose jaunâtre clair après 5 mois, gris bleuâtre clair (190) D. rien	modéré modéré modéré; blanc à rose clair (4) rien

	agar d'amidon+sels minéraux (ISP n° 4)	G. abondant R. blanc jaunâtre (92)	modéré rose jaunâtre clair (28)	modéré rose jaunâtre clair (28)
5		A. abondant; rose clair (4) à gris rosâtre (10) D. rien	modéré; gris bleu clair (190) rien	abondant, bleu pâle (185) rien
	agar de tyrosine (ISP N°4)	G. modéré R. blanc jaunâtre (29)	modéré rose jaunâtre fort (26)	modéré rose jaunâtre fort (26)
10		A. faible; rose jaunâtre clair (28), plus tard (5 mois), par- tiellement gris bleuâtre clair (190) D. rien	modéré; blanc à rose clair (4) rien	modéré; blanc à rose clair (4) rien
	agar nutritif	G. faible à modéré R. jaune pâle (89)	faible incolore à rose pâle (7)	faible incolore à rose pâle (7)
15		A. rien D. rien	rien rien	rien rien
	agar extrait de malte +extrait de levure (ISP n° 2)	G. abondant R. jaune pâle (89)	abondant rose jaunâtre fort (26)	abondant rose jaunâtre fort (26)
20		A. faible; blanc (263) D. rien	faible; blanc à rose pâle (7) rien	faible; blanc à rose pâle (7) rien
	agar de farine d'avoine (ISP n° 3)	G. modéré R. incolore à rose pâle (7)	faible rose jaunâtre pâle (31)	faible rose jaunâtre pâle (31)
25		A. faible, blanc rosâtre (9) à gris bleuâtre clair (190) D. rien	très rare; bleu pâle vif (184) rien	très rare; bleu pâle vif (184) rien
	agar de Bennett	G. abondant R. jaune grisâtre (90)	abondant rose jaunâtre fort (26)	abondant rose jaunâtre fort (26)
30		A. modéré; blanc (263) à blanc jaunâtre (92) D. rien	modéré; rose jaunâtre pâle (31) et blanc bleuâtre (189) rien	rien rien
	agar fer-extrait de levure peptone (ISP n° 6)	G. modéré R. incolore A. rien D. rien	abondant incolore rien rien	abondant incolore rien rien

35

* observé après incubation à 35°C pendant 3 semaines,

** abréviations: G = croissance, R = couleur inverse, A = mycélium aérien, D = pigment diffusible,

*** couleur et nombre entre parenthèses suivent la norme de couleur selon Kelly, K.L. et D.B. Judd; ISCC-NBS chartes des noms de couleurs illustrés par Colors Centroid. U.S. Dept. of Comm. Cir. 553, Washington, D.C., Nov. 1975.

TABLEAU 2

Caractéristiques physiologiques de la souche H 964-92

<u>Essai</u>	<u>Réponse</u>	<u>Méthode et milieu</u>
5 Domaine de température pour la croissance	Croissance maximum entre 28°C et 37°C Modérée à 20°C et 43°C. Aucune croissance à 10°C et 47°C.	Agar de Bennett
10 Liquéfaction dans la gélatine	Liquéfiée	Milieu gélatine+ peptone+glucose
Hydrolyse dans l'amidon	Hydrolysée	Plaque d'agar d'amidon
15 Réaction dans du lait écrémé	Non coagulée et complète- ment peptonisé	Lait écrémé Difco
20 Formation de pigment mélanoïde	Non produit	Agar de tyrosine, agar de fer+levure+ peptone et bouillon d'extrait de levure +tryptone
Réduction par le nitrate	Non réduit	bouillon de nitrate +glucose de Czapek et bouillon de nitrate+extrait de levure+glucose
25 Résistance NaCl	Croissance à 5% ou moins Aucune croissance à 7%	Agar d'extrait de levure+tryptone
30 Lysozyme	Résistant. Croissance à 0,01% en moins. Aucune croissance à 0,1%	Agar d'extrait de levure+tryptone
35	Croissance entre 5,0 et 9,5 Aucune croissance à 4,5 et à 10,0.	Agar d'extrait de levure+tryptone

TABLEAU 3

Utilisation des sources de carbone

	<u>Souche n° H 964-92</u>		<u>Actinomadura</u>
	<u>Souche originale</u>	<u>Mutant n° A1327Y</u>	<u>Verrucosospora</u>
			<u>KCC A-0147</u>
5			
. glycérol	+	+	+
. D(-)-arabinose .	-	-	-
. L(+)-arabinose .	+	+	+
. D-xylose	+	+	+
10 . D-ribose	+	-	-
. L-rhamnose	+	+	+
. D-glucose	+	+	+
. D-galactose	-	-	-
. D-fructose	+	+	+
15 . D-mannose	-	-	-
. L(-)-sorbose ...	-	-	-
. sucrose	+	+	+
. lactose	-	-	-
. cellobiose	+	+	+
20 . mélibiose	-	-	-
. théhalose	+	+	+
. raffinose	-	-	-
. D(+)-mélézitose	-	-	-
. amidon soluble .	+	+	+
25 . cellulose	+	+	+
. dulcitol	-	-	-
. inositol	+	-	-
. D-mannitol	+	+	+
. D-sorbitol	-	-	-
30 . Salicine	-	-	-

Observé après incubation à 28°C pendant 3 semaines,
milieu de base: milieu minéral Gottlieb-Pridham.

Composition des parois de la cellule et constituants sucre de l'ensemble de la cellule

35 La paroi cellulaire purifiée de la souche H 964-92 contient de l'acide mésodiaminopimélique mais manque de glycine. L'hydrolysate de l'ensemble de la cellule montre la présence de madurose (3-O-méthyl-D-galactose), de glucose et de ribose. L'acide-amino de la paroi de la

cellule et la totalité des constituants sucre de la cellule indiquent que la souche H 964-92 est une paroi cellulaire du type III_B. Deux constituants majeurs de ménaquinone sont identifiés en tant que MK-9(H₆) et MK-9(H₈).

5 Position taxonomique de la souche H 964-92

La souche H 964-92 présente les caractéristiques majeures suivantes:

- (1) chaînes de spore aériennes: courtes, allongées, flexueuses ou tortueuses quant à la forme;
- 10 (2) spores: surface verruqueuse;
- (3) mycelium aérien: couleur rosâtre ou bleuâtre;
- (4) mycélium du substrat: rosâtre dans certains milieux;
- (5) pigment diffusible: aucun;
- (6) mésophile
- 15 (7) paroi de la cellule du type III_B;
- (8) système ménaquinone: MK-9(H₆) et MK-9(H₈).

Ces caractéristiques majeures indiquent que la souche H 964-92 est du genre *Actinomadura*. Les espèces déjà connues du genre *Actinomadura* ont été isolées sur des mammifères. Certaines souches ont également été
 20 obtenues à partir de plantes. Cependant, la plupart des nouvelles espèces proposées récemment ont été isolées à partir du sol. Selon la taxonomie numérique et la classification de l'*Actinomadura* et des actinomycètes qui lui sont apparentés de Goodfellow et coll. dans *J. Gen. Microbiol.* 112: 95-111 (1979), la plupart des espèces d'*Actinomadura* d'origine
 25 terrienne sont spécifiées dans le groupe 7 des 14 groupes décrits. La souche H 964-92 est plutôt apparentée à l'espèce du groupe 7. *Nonomura* et *Ohara* dans *J. Ferment. Technol.* 49: 904-912 (1971) ont indiqué l'existence de cinq espèces de saprophytes du genre *Actinomadura* et *Nonomura* (*J. Ferment. Technol.* 52: 71-77, 1974) et *Preobrazhenskaya* et coll.
 30 (*Actinomycetes and Related Organisms* 12: 30-38, 1977) ont publié les clés de l'identification et de la classification des espèces du genre *Actinomadura*. Comme résultat de la comparaison des descriptions des trente espèces comprenant des organismes décrits dans les brevets, la souche H 964-92 apparaît la plus semblable à l'*Actinomadura coerulea*
 35 décrite par *The Preobrazhenskaya* et coll., (référence infra) et *Actinomadura verrucosospora* décrite par *Nonomura*, (référence infra).

La souche n° H 964-92 est directement comparée à la souche *A. verrucosospora* KCC A-0147 et on a constaté qu'elle est étroitement apparentée à *A. verrucosospora* quant à ses caractéristiques morphologiques,

caractéristiques de culture et caractéristiques physiologiques. Ainsi, la souche H 964-92 est classifiée en tant que nouvelle souche d'Actinomadura verrucosospora.

Il faut bien comprendre que pour la production de BBM-1675, la présente invention quoique décrite en détail en référence à la souche particulière Actinomadura verrucosospora, souche H 964-92 (ATCC 39334) et à la souche de mutants à laquelle elle a conduit, désignée sous le nom de souche A1327Y (ATCC 39638), ne saurait être limitée à ces micro-organismes ou à des micro-organismes totalement décrits par les caractéristiques de culture indiquées ici. Il est bien entendu que de façon spécifique, l'invention embrasse toutes les souches H 964-92 et tous les mutants produits naturellement ou artificiellement de la BBM-1675 ainsi que les variantes qui en dérivent.

Production antibiotique

Les antibiotiques BBM-1675 de la présente invention peuvent être préparés par culture d'une souche productrice de BBM-1675 du genre Actinomadura verrucosospora, de préférence une souche d'Actinomadura verrucosospora présentant les caractéristiques d'identification de l'ATCC 39334 ou ATCC 39638, ou d'un de leur mutant, dans un milieu nutritif aqueux convenable. L'organisme se développe dans un milieu nutritif contenant des sources nutritionnelles connues convenant aux actinomycètes, c'est-à-dire des sources assimilables de carbone et d'azote plus éventuellement des sels minéraux et autres facteurs de croissance connus. Des conditions aérobies submergées sont de préférence employées pour la production de grandes quantités d'antibiotiques, quoique pour la production de petites quantités, des cultures de surface ou en flacons puissent également être utilisés. Les procédures généralement utilisées pour la culture d'autres actinomycètes sont applicables au procédé selon la présente invention.

Le milieu nutritif doit contenir une source de carbone assimilable convenable, tel que glycérol, L(+)-arabinose, D-xylose, D-ribose, L-rhamnose, D-glycose, D-fructose, sucrose, cellobiose, amidon soluble, D-mannitol ou inositol. En tant que sources d'azote, on peut citer le chlorure d'ammonium, le sulfate d'ammonium, l'urée, le nitrate d'ammonium, le nitrate de sodium, etc., utilisé seul ou en combinaison avec des sources d'azote organique telles que peptone, extrait de viande, extrait de levure, liqueur de maïs, poudre de soja, farine de graine de coton, etc. On peut également ajouter, le cas échéant, des sels minéraux nutritifs pour fournir des sources de sodium, de potassium, de calcium,

d'ammonium, de phosphate, de sulfate, de chlorure, de bromure, de carbonate, de zinc, de magnésium, de manganèse, de cobalt, de fer et similaire.

La production des antibiotiques BBM-1675 peut être effectuée à 5 n'importe quelle température convenant à la croissance convenable de l'organisme producteur, c'est-à-dire de 15 à 45°C et est de façon convenable, mise en oeuvre à une température de l'ordre de 27 à 32°C. En général, la production optimum est obtenue après une période d'incubation de 68 à 180 heures en fonction des méthodes employées (secouage, 10 agitation ou fermentation. Lorsque la fermentation en réservoirs est mise en oeuvre, il est souhaitable de produire un inoculum végétatif dans un bouillon de culture par inoculation de la culture du bouillon par une quelconque culture telle culture de sol ou culture lyophilisée de l'organisme producteur. Après obtention d'un inoculum actif selon 15 cette méthode, celui-ci est transféré de façon aseptique au milieu du réservoir de fermentation. La production d'antibiotique peut être surveillée par le test de diffusion agar sur disque de papier à l'aide de *Staphylococcus aureus* 209P constituant l'organisme test.

Isolement et purification

20 Lorsque la fermentation est achevée, le complexe BBM-1675 peut être obtenu à partir du bouillon par les procédures d'isolement conventionnelles telles qu'extraction par solvant. Ainsi par exemple, l'ensemble du bouillon peut être séparé par filtration et centrifugation dans un récipient mycéliel et un surnageant du bouillon de culture. L'antibio- 25 tique dans le gâteau mycéliel peut être récupéré par suspension du gâteau dans du méthanol, séparation par filtration des matières insolubles et concentration de l'extrait méthanolique. L'activité du surnageant du bouillon peut être récupérée par extraction à l'aide de n-butanol. Les extraits de méthanol et de n-butanol mentionnés ci-dessus peuvent alors 30 être combinés et évaporés par une méthode azéotropique dans une solution aqueuse dans laquelle se dépse la plus grande partie de l'activité antibiotique sous la forme d'un solide huileux. Le solide peut alors être dissous dans le méthanol et la solution est filtrée. Le filtrat est concentré et ajouté à un mélange d'acétate d'éthyle et d'eau. L'extrait 35 organique résultant contient le complexe BBM-1675 brut qui peut être séparé de la solution par addition d'un anti-solvant tel que le n-hexane.

Le complexe BB-1675 brut est un mélange de divers constituants y compris les constituants bioactifs majeurs BBM-1675 A₁ et A₂, et de

quatre constituants bioactifs mineurs BBM-1775 A₃, A₄, B₁ et B₂. Ces constituants bioactifs peuvent être séparés et purifiés par des procédures chromatographiques classiques. Selon un mode de mise en oeuvre du procédé, le complexe BBM-1675 brut est tout d'abord dissous dans le

5 méthanol et purifié par une chromatographie dans une colonne de Sephadex LH-20 à l'aide de méthanol agissant en tant que solvant d'élution. Ce complexe partiellement purifié peut alors être chromatographié sur une colonne de gel de silice éluée par étapes à l'aide de chloroforme plus une concentration croissante de méthanol pour conduite à BBM-1675 A₁, un

10 mélange de BBM-1675 A₂, A₃ et A₄ et un mélange BBM-1675 B₁ et B₂. Le constituant A₁ peut subir une purification supplémentaire dans une colonne de chromatographie Sephadex LH-20, le méthanol constituant le solvant d'élution. Le mélange de A₂, A₃ et A₄ peut être séparé par chromatographie sur une colonne de Bondapak C₁₈ (Waters Associates, Inc.) faisant

15 emploi de concentrations croissantes d'une solution aqueuse d'acétonitrile en tant qu'éluant. Le mélange des constituants B₁ et B₂ peut être séparé par chromatographie sur une colonne de gel de silice employant un mélange de chloroforme et de méthanol en tant que solvant d'élution. D'autres détails des procédures de séparation chromatographique préférées

20 sont donnés dans les exemples qui suivent.

Propriétés physico-chimiques des constituants BBM-1675

Les six constituants bioactifs du complexe BBM-1675 se distinguent les uns des autres par deux systèmes de chromatographie en couche mince (TLC) ainsi que le montre le tableau suivant.

25

TABLEAU 4

Chromatographie en couche mince des constituants de BBM-1675

Constituant	Valeurs R _f	
	SiO ₂ CHCl ₃ -CH ₃ OH (5/1 v/v)	* silanisée CH ₃ CN-H ₂ O (75/25 v/v)
30 . BBM-1675 A ₁	0,74	0,18
. BBM-1675 A ₂	0,71	0,21
. BBM-1675 A ₃	0,72	0,28
. BBM-1675 A ₄	0,71	0,78
. BBM-1675 B ₁	0,63	0,23
35 . BBM-1675 B ₂	0,60	0,16

* gel de silice en phase inverse C₁₈.

La séparation de BBM-1675 A_2 , A_3 et A_4 est difficile à l'aide d'un système de chromatographie en couche mince en phase ordinaire mais peut être obtenue par chromatographie en couche mince en phase inverse.

Les constituants de BBM-1675 individuels présentent une solubilité et des réactions colorées semblables les uns aux autres. Par exemple, ils sont solubles dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'éthanol et le méthanol, légèrement solubles dans le benzène et l'eau et insolubles dans le n-hexane et le tétrachlorure de carbone. Ils donnent lieu à des réactions positives avec le chlorure de fer, les réactifs d'Ehrlich et de Tollen et à des réponses négatives aux essais de Sakaguchi, à la ninhydrine et à l'anthrone.

Les propriétés physico-chimiques caractéristiques des constituants de BBM-1675 sont consignées dans le tableau 5 ci-dessous.

TABLEAU 5

15 Propriétés physico-chimiques des constituants de BBM-1675

	BBM-1675 A_1	A_2	A_3	A_4	B_1	B_2
point de fusion (dec)	156-158°C	147-149°C	125-127°C	123-126°C	159-161°C	156-159°C
$(\alpha)_D^{27}$ (c 0,5, $CHCl_3$)	-191°	-179,4°	-161°	-176°	-171°	-122°
Analyse trouvée (%)						
C:	51,52	53,81	55,00	53,67		
H:	5,81	6,31	6,52	6,35		
N:	4,02	3,82	3,57	3,45		
(par différence)	O: 38,65	36,06	34,91	36,53		
UV λ_{max} nm ($E_{1cm}^{1\%}$) dans CH_3OH	253 (325) 282 (195) 320 (143)	253 (281) 282 (172) 320 (128)	253 (286) 282 (158) 320 (122)	253 (257) 282 (153) 320 (117)	253 (225) 282 (140) 320 (104)	248 (212) 279 (141) 318 (103)
25 dans HCl- CH_3OH 0,01N	253 (323) 282 (192) 320 (144)	253 (276) 282 (167) 320 (128)	253 (287) 282 (160) 320 (126)	253 (258) 282 (155) 320 (118)	253 (225) 282 (140) 320 (105)	248 (210) 279 (140) 318 (103)
30 dans NaOH- CH_3OH 0,01N	252 (325) 283 (172) 318 (136)	252 (289) 283 (171) 318 (122)	252 (280) 283 (162) 318 (120)	252 (266) 283 (160) 318 (118)	252 (236) 282 (141) 318 (105)	248 (233) 278 (150) 318 (110)
Poids moléculaire (valeur approximative) (gel HPLC, gel Finepak 101).	1 300	1 100	1 100	1 400		

L'absorption ultraviolette maximum des constituants BBM-1675 observée à 253, 282 et 320 nm, ne varie pas que ce soit en solution acide ou en solution alcaline. Les spectres IR et RMP de BBM-1675 A_1 , A_2 , A_3 et A_4 sont consignés dans les figures 1 à 4, et 5 à 8 respectivement. Le spectre RMP à 360 MHz de BBM-1675 A_1 indique la présence d'un groupe

acétyle (δ : 2,11 ppm), d'un groupe N-CH₃ (2,52 ppm), de quatre groupes OCH₃ (3,42; 3,80; 3,88 et 3,98 ppm) et d'un groupe exométhylène (4,57 et 5,48 ppm) en même temps que la présence de deux protons aromatiques (7,50 et 8,59 ppm) et d'un proton NH (11,79 ppm). Le spectre RMC de

5 BBM-1675 A₁ présente 55 signaux de carbone incluant un signal d'intensité triple (δ : 56,0 ppm, OCH₃). La formule moléculaire de BBM-1675 A₁ semble être C₅₇H₇₂N₄O₃₂ si l'on se base sur le spectre RMN au ¹³C et spectre protonique, la détermination du poids moléculaire par HPLC et SIMC (spectrométrie de masse ionique secondaire) et la microanalyse.

10 Etude structurelle de BBM-1675 A1

Après traitement à l'aide de HCl-CH₃OH 0,5N à température ambiante, la BBM-1675 A₁ perd sa bioactivité et fournit une substance chromophore lipophile (composé I) en même temps que divers fragments non identifiés. Le composé I présente une absorption ultraviolette similaire à

15 celle de l'antibiotique parent ce qui montre que le composé I conserve la structure chromophore du BBM-1675 A₁. Deux autres fragments chromophores apparentés au composé I sont obtenus par hydrolyse alcaline de BBM-1675 A₁. L'hydrolyse avec KOH-CH₃OH 0,05N à 55°C durant 1 h conduit au composé II présentant une absorption ultraviolette maximum à 252,

20 284, 297 (épaulement) et 322 nm, tandis que la réaction dans KOH-CH₃OH 1N conduit à une substance chromophore acide appelée composé III. Les propriétés physico-chimiques des composés I, II et III sont résumées dans le tableau 6 ci-dessous.

TABLEAU 6

25

<u>Propriétés des composés I, II et III</u>			
	<u>Composé I</u>	<u>Composé II</u>	<u>Composé III</u>
point de fusion	82-83°C	133°C	253-255°C
(α) _D ²⁹ (c 0,2 CHCl ₃)	-100°	0	0
30 formule moléculaire	C ₂₁ H ₃₁ NO ₁₀	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	C ₁₃ H ₁₅ NO ₆
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ nm (ϵ)	244 (21 850)	252 (26 600)	248 (26 900)
	276 (9 400)	283 (11 200)	295 (14 400)
	318 (6 300)	197(sh 8 800)	310 (13 500)
35		322 (11 700)	

	Composé I	Composé II	Composé III
MS m/z	457 (M ⁺)	295 (M ⁺)	281 (M ⁺)
	425	280	263
	341	263	236
5	281	251	222
	264	248	218
TLC			
(xylène- [*] MEK-CH ₃ OH=			
5/5/1 v/v)	Rf 0,58	0,66	0,13
10	*MEK = méthyléthylcétone		

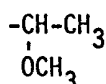
Les informations relatives à la structure des composés II et III sont obtenues à partir de la transformation chimique et des données de spectres suivantes.

15 La RMN protonique au ¹³C indique la présence de quatre groupes OCH₃, un groupe =CH₂, sept groupes -C=, deux groupes >C=O et un groupe >NH dans le composé II.

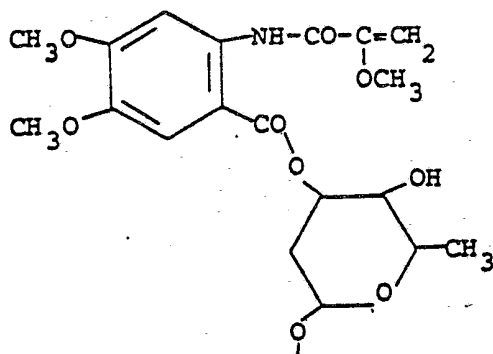
Le spectre RMN du composé III est semblable à celui du composé II et ne diffère que par l'absence d'un des quatre groupes OCH₃ observés pour le composé II. Cette différence, en même temps que la nature acide du composé III, suggère que le composé II est un ester méthylique du composé III. 20 Lorsqu'il est chauffé sous reflux à l'aide de KOH 1N méthanolique, le composé II est converti quantitativement en composé III tandis que le composé III est converti en le composé II par traitement par le diazo-méthane. Le traitement du composé II à l'aide de NaBH₄ dans C₂H₅OH conduit 25 à un produit de réduction (composé IV, M⁺:m/z 267) qui montre un groupe -CH₂OH dans le RMN au lieu du groupe -COOCH₃ du composé II. Après hydrogénéation sur palladium fixé sur charbon, le composé II conduit à la formation d'un dérivé dihydro (composé V, M⁺:m/z 297). Le spectre RMN 30 protonique du composé V montre un signal méthyle sous forme d'un doublet nouveau et l'absence du groupe exométhylène présent dans le composé II. De plus, l'un des groupes OCH₃ apparaît pour un champ (δ: 3,50 ppm) plus élevé du composé V. Ces résultats indiquent la présence d'un groupe:



35 dans le composé II qui est réduit après hydrogénéation en le groupe



dans le composé V. Le composé II est chauffé par de l'acide chlorhydrique méthanolique 1,5N à 80°C durant 3 heures et l'hydrolysate est



5

10

Ultérieurement au dépôt de la demande de brevet de base aux U.S.A. n° 495 231, on a constaté que les constituants BBM-1675 A₁ et A₂ décrits ci-dessus, et produits conformément à l'exemple 2 ci-dessous, ne sont en fait pas complètement purs et que certaines des propriétés caractérisantes utilisées pour définir de telles constituants ne sont pas exactes. En suivant les procédures de purification chromatographiques supplémentaires telles que décrites plus en détail dans les exemples 3 et 6 ci-dessus, on isole la BBM-1675 A₁ et la BBM-1675 A₂ sous forme plus purifiée et totalement caractérisée ainsi que décrit ci-dessous. De même, les données de l'analyse élémentaire des constituants A₃ et A₄ sont révisées pour montrer la présence de soufre dans ces composés et les durées de rétention HPLC sont calculées pour ces deux constituants. On a résumé ci-dessous les propriétés physico-chimiques révisées des constituants de BBM-1675.

25

BBM-1675 A₁

Description: cristaux de couleur blanche à jaune pâle;
point de fusion 156-158° (avec décomposition)

Analyse élémentaire:

	<u>Analyse 1</u>	<u>Analyse 2</u>	<u>Moyenne</u>
30	C: 51,60%	C: 52,74%	C: 52,17%
	H: 6,31%	H: 5,99%	H: 6,15%
	N: 5,31%	N: 3,94%	N: 4,63%
	S: 8,47%	S: 9,71%	S: 9,09%
	O (par différence):	O (par différence):	O (par différence)
35	28,31%	27,62%	27,96%

Spectre d'absorption ultraviolette: appareil UV Varian, Cary 219
solvant: méthanol
concentration: 0,01356 g/l

	λ_{max} (nm)	absorptivités
	320	12,4
	280	sh (épaulement)
	253	25,1
5	210	25,5

Aucune variation significative avec un acide ou une base.

Rotation optique: solvant - CHCl_3
 $(\alpha)_D^{24} = -207^\circ (C = 0,0351)$

10 Une deuxième analyse montre la rotation optique suivante:
 $(\alpha)_D^{27} = -191^\circ (C = 0,5, \text{CHCl}_3)$

Spectre d'absorption infrarouge: cf. figure 9

15 bandes d'absorption majeures (KBr):
 985, 1015, 1070, 1110, 1150, 1210, 1250, 1308, 1380,
 1405, 1446, 1520, 1592, 1608, 1668, 1715, 2920, 2960,
 3360, 3440 cm^{-1} .

20 Spectre de masse: instrument - VG-ZAB-2F
 FAB-MS-thioglycérol
 ions du domaine de poids moléculaire (m/z): 1249,
 1357, 1463; avec addition de NaCl (m/z): 1271, 1379,
 1485, 1597.
 25 FAB-MS-MB (MB: matrice, poids moléculaire 154); ions
 du domaine de masse moléculaire (m/z): 1249, 1283,
 1403, 1555; avec addition de NaCl (m/z): 1249, 1271,
 1303, 1425, 1483, 1577.
 30 FAB-MS-glycérol-DMSO: ions du domaine de masse moléculaire
 (m/z): 1215, 1247, 1279, 1293, 1325, 1353; avec
 addition de NaCl (m/z): 1215, 1247, 1247, 1269, 1325,
 1347, 1375.
 Instrument: Kratos MS-50
 FAB-MS-thioglycérol; ions du domaine de masse moléculaire
 (m/z): 1347, 1463.

35 Poids moléculaire

(basé sur les données du spectre
 de masse indiquées ci-dessus)

poids moléculaire
 apparent: 1248

Spectre de résonance magnétique nucléaire: Instrument - WM360 Bruker

Solvant: CDCl_3

5 RMN¹: 360 MHz δ (ppm): 11,75 (1H, s); 8,55 (1H, s);
7,45 (1H, s); 6,61 (1H, m); 6,23 (1H, brs); 6,17 (1H,
brs); 5,93 (1H, d, I = 9,3); 5,82 (1H, d, I = 9,3);
5,7 (1H, brs); 5,49 (1H, m); 5,45 (1H, d, I = 2,3);
5,38 (1H, brs); 4,95 (1H, d, I = 10,2); 4,64 (2H, m);
4,54 (1H, d, I = 2,3); 4,2 (1H, s); 4,15-3,35
10 (26-28H) {4,10 (1H,m); 4,02 (1H, brs); 3,95 (3H, s);
3,85 (3H, s); 3,79 (3H, s); 3,46 (1H, m); 3,40 (3H,
s)}; 2,82-2,70 (3H, brm); 3,50 (3H, s); 2,47 (1H, m);
2,38-2,22 (5H); 2,12 (1H, m); 2,11 (3H, s); 1,60-1,05
(22H) {1,39 (3H, d, I = 6,3); 6,31 (3H, d, I = 6,3);
1,29 (3H, d, I = 6,3); 1,08 (6H)}.

15 Cf. Figure 10

Résonance magnétique nucléaire au ^{13}C : 90,3 MHz.

Cf. Figure 11.

Dans un essai distinct, le spectre de résonance magnétique nu-
cléaire au ^{13}C de la BBM-1675 A_1 purifié est déterminé pour un échantil-
20 lon dissous dans CdCl_2 (80 MHz). Les pics majeurs sont indiqués ci-
dessous.

RMC de BBM-1675 A_1 (80 MHz dans CDCl_3)

	<u>Pic chimique en ppm (multiplicité)</u>						
25	BBM-1675 A_1	13,7(q)	16,6(q)	17,5(q)	19,8(q)	22,2(a)	22,6(q)
		23,4(q)	29,0(t)	34,0(t)	25,1(t)	39,5(t)	47,2(d)
		52,5(q)	55,6(u)	56,0(q)	57,1(d)	62,4(t)	64,5(d)
		67,7(d)	68,2(d)	68,8(t)	69,2(d)	69,6(t)	70,2(d)
		71,9(d)	76,0(d)	76,6(d)	77,1(u)	77,3(d)	83,4(s)
		86,6(d)	88,4(s)	90,5(t)	97,2(d)	98,3(s)	99,0(d)
30		99,6(d)	103,8(d)	107,6(s)	112,5(d)	123,1(d)	124,9(d)
		130,1(d)	131,5(s)	134,9(s)	136,7(s)	144,0(s)	147,2(s)
		153,8(s)	154,4(s)	155,0(s)	160,7(s)	166,4(s)	191,8(s)

* multiplicité - q = quartet; d = doublet; u = incertain

35

t = triplet; s = singulet.

BBM-1675 A₂

Description: cristaux blanc; point de fusion 147-149°C.

Analyse élémentaire: C: 52,71%

H: 5,94%

5 N: 3,94%

S: 9,39%

O (par différence): 28,01%

Spectre d'absorption ultraviolette: appareil UV Varian, Cary 219

solvant - méthanol

10 concentration - 0,02052 g/l

λ_{\max} (nm)	absorptivités
320	12,2
282	16,3
252	26,2
15 214	25,8

Aucune variation significative avec un acide ou une base.

Rotation optique: $(\alpha)_D^{27} = -279,4^\circ (C = 0,5, \text{CHCl}_3)$

Spectre d'absorption infrarouge: cf. figure 12

20 Instrument: Beckman Modèle IR 4240

bandes d'absorption majeures (KBr):

950, 1015, 1070, 1100, 1155, 1213, 1250, 1313, 1375,
1405, 1450, 1520, 1595, 1610, 1685, 1735, 2940, 2980,
3440 cm^{-1} .

25 Spectre de masse: instrument - VG-ZAB-2F

FAB-MS-thioglycérol

ions du domaine de poids moléculaire (m/z): 968,

1249, 1355, 1357, 1463, 1579; avec addition de NaCl

(m/z): 990, 1271, 1379, 1485, 1593.

30 FAB-MS-MB (MB: matrice, poids moléculaire 154); ions

du domaine de masse moléculaire (m/z): 1249, 1403,

1419, 1555, 1571, 1587; avec addition de NaCl (m/z):

1249, 1271, 1425, 1441, 1457, 1483, 1577.

35 FAB-MS-glycérol-DMSO: ions du domaine de masse molé-

culaire (m/z): 1215, 1231, 1247, 1263, 1279, 1293,

1309, 1325, 1326, 1341, 1353, 1369.

Poids moléculaire (basé sur les données de spectre de masse décrit

ci-dessus): poids moléculaire apparent: 1248

Spectre de résonance magnétique nucléaire: cf. figure 13.

Instrument - WM360 Brucker

Solvant: CDCl_3

5 RMN¹: 360 MHz δ (ppm): 11,91 (1H,s); 8,62 (1H, s);
 7,58 (1H, s); 6,56 (1H,m); 6,22 (1H,s); 6,15 (1H,
 10 brs); 5,91 (1H, d, I = 9,6); 5,83 (1H, d, I = 9,6);
 5,70 (1H, m); 5,45 (1H, d, I = 2,2); 5,44 (1H, s);
 5,34 (1H, brs); 4,95 (1H, d, I = 10,2); 4,75 (1H, m);
 4,65 (1H, d, I = 6,8); 4,54 (1H, d, I = 2,2); 4,47
 15 (1H, m); 4,18 (1H, s); 4,10 (1H, brs); 4,05-3,50
 (20-24H); {3,96 (3H, s); 3,87 (3H, s); 3,77 (3H, s)};
 3,46 (1H, m); 3,39 (3H, s); 2,79 (1H, m); 3,73 (2H,
 m); 2,50 (3H, s); 2,50 (1H, m); 2,38-2,22 (3H); 2,14
 (1H, m); 2,10 (3H, s); 1,98 (2H, m); 1,65-1,45 (6-8H);
 1,38 (3H, d, I = 6,0); 1,34 (3H, d, I = 6,0); 1,22
 (3H, d, I = 6,8); 1,10 (6H).

Résonance magnétique nucléaire au ^{13}C : 90,3 MHz.

Cf. Figure 14.

20 Dans un essai distinct, le spectre de résonance magnétique nu-
 cléaire au ^{13}C de la BBM-1675 A₂ purifié est déterminé pour un échantil-
 lon dissous dans CdCl_2 (80 MHz). Les pics majeurs sont indiqués ci-des-
 sous.

BBM-1675 A ₂	13,7	16,9	17,5	19,8	22,3	22,7	23,4	33,1
25	34,1	35,1	39,3	47,6	52,6	55,7	56,0	56,1
	57,6	62,4	64,5	64,9	65,9	68,3	69,2	69,7
	71,9	73,6	75,8	76,1	77,1	77,7	78,1	78,3
	83,3	86,2	88,4	90,4	97,2	98,3	99,1	99,5
	99,6	103,8	107,1	112,4	123,2	124,8	129,9	137,3
30	144,1	154,2	154,5	160,9	167,9	192,2		

TABLEAU 7

Propriétés physico-chimiques des BBM-1675 A₃, A₄, B₁, B₂

point de fusion (dec)	A ₃ , A ₄ , B ₁ , B ₂			
	A ₃ 125-127°C	A ₄ 123-126°C	B ₁ 159-161°C	B ₂ 156-159°C
35 (α) _D ²⁷ (c 0,5, CHCl_3)	-161°	-176°	-171°	-122°
Analyse trouvée (%)	C:	54,55	54,65	
	H:	6,46	6,29	
	N:	3,73	3,51	
	S:	7,49	8,07	

	A ₃	A ₄	B ₁	B ₂
UV λ _{max} nm (E _{1cm} ^{1%}) dans MeOH	253 (286)	253 (257)	243 (225)	248 (212)
	282 (158)	282 (153)	282 (140)	279 (141)
	320 (122)	320 (117)	320 (104)	318 (103)
5 dans HCl 0,01N-MeOH	253 (287)	253 (258)	253 (225)	248 (210)
	282 (160)	282 (155)	282 (140)	279 (140)
	320 (126)	320 (118)	320 (105)	318 (103)
dans NaOH 0,01N-MeOH	252 (280)	252 (266)	252 (236)	248 (233)
	283 (162)	283 (160)	282 (141)	278 (150)
10	318 (120)	318 (118)	318 (105)	318 (110)

Résultat de la chromatographie en couche mince (TLC) et de la chromatographie liquide à performance élevée sur les constituants BBM-1675

A. Etude n° 1 - résumé

15

TABLEAU 8

TLC et HPLC des constituants BBM-1675

	TLC (Rf)		HPLC (durée de rétention en minutes)
	SiO ₂ CHCl ₃ -MeOH (5/1 v/v)	CH ₃ CN-H ₂ O silanisé * (75/25 v/v)	Lichrosorb RP-18 CH ₃ CN-MeOH-0.1M CH ₃ COONH ₄ (5/2/3 v/v)
BBM-1675 A ₁	0,74	0,18	13,3
BBM-1675 A ₂	0,71	0,21	17,3
BBM-1675 A ₃	0,72	0,28	8,0
25 BBM-1675 A ₄	0,71	0,78	5,1
BBM-1675 B ₁	0,63	0,23	-
BBM-1675 B ₂	0,60	0,16	-

* gel de silice en phase inverse C₁₈.

B. Etude n° 2 - TLC et HPLC pour des constituants A₁ et A₂ purifiés

30 TLC chromatographie

On utilise pour toutes les chromatographies en phase normale des plaques du type dit Uniplates de gel de silice GHLF d'Analtech. On utilise des plaques de 2,5 cm x 10 cm pour une chromatographie en couche mince en une dimension. On procède au développement dans des cylindres de verre mesurant 6,4 cm de diamètre sur 12 cm de longueur et contenant 10 ml d'éluant. Des plaques mesurant 7,5 x 10 cm sont utilisés pour la chromatographie en couche mince en deux dimensions. L'échantillon est appliqué sur le coin gauche inférieur à 1 cm des bords. La plaque est

développée d'abord dans un récipient (largeur 12,7 cm, 8,6 cm de profondeur, 13 cm de hauteur) contenant 50 ml du premier éluant. La plaque est alors séchée à l'air, tournée de 90° en sens contraire des aiguilles d'une montre et développée dans un deuxième récipient contenant 50 ml du
5 deuxième éluant.

Les plaques analytiques de gel de silice C₁₈ prérevêtues du type Whatman sont utilisées pour toutes les étapes de chromatographie en phase inverse. Les plaques mesurant 2,5 cm x 7,6 cm sont développées dans des cylindres en verre contenant 10 ml d'éluant.

10 Les plaques de phase normale sont placées tout d'abord sous lumière ultraviolette à 254 nm. Les plaques sont alors insérées dans un récipient en verre (6,4 cm de diamètre x 12 cm de longueur) contenant des cristaux I₂. Les plaques sont alors examinées après environ 2 minutes. Les plaques de phase inverse sont visualisées sous une lumière
15 ultraviolette à 254 nm seulement. On détecte des zones en essayant par trempe la fluorescence d'un colorant imprégné.

HPLC analytique

Les constituants suivants sont utilisés pour construire un système HPLC analytique. Une pompe de système de distribution de solvant
20 modèle 6000A de Waters Associates; un varian Varichrom modèle VUV-10 par rapport à un système de détecteur à 254 nm 0,1 OD; un panneau d'enregistrement série 5000 d'enregistrement Fisher; des programmeurs de solvant modèle 660 Waters Associates; un injecteur modèle U6K de Waters Associates, une colonne de 10µ, µ-Bondapak C₁₈ d'Alltech (diamètre 4,6mm x 25cm)
25 avec une colonne de garde Pell ODS (0,03-0,038 mm) de Whatman Co. Les constituants sont reliés à un tube en acier inoxydable 316 (1,6 mm de diamètre - 0,23 mm de longueur). L'éluant est amené par pompe sous un débit de 2 ml/mn pendant la totalité de l'analyse.

HPLC préparative

30 Les constituants suivants sont utilisés pour créer un système de chromatographie liquide à pression moyenne: une pompe de laboratoire modèle RP-SY 2CSC FMI de la Société Fluid Metering, Inc.; un humidificateur par pulsation modèle PD-60LF FMI de la Société Fluid Metering, Inc.; une boucle d'échantillon de 15 ml construite à partir d'un tube de
35 polypropylène (3,0 mm de diamètre x 1,5 mm de longueur) enroulé autour d'un tube de carton (8,65 cm de diamètre); des colonnes séries 3500 Universal LC de Glenco; un appareil de contrôle d'absorption/fluorescence modèle UA-5 de Instrument Specialties Co. avec une unité optique de type 6; une valve d'interruption de débit modèle 590 de la Société

Instrumentation Specialties Co.; et un collecteur de fraction modèle 328 de la Société Instrumentation Specialties Co.

Les divers éléments sont reliés par des canalisations en polypropylène et en téflon (3,0 mm de diamètre x 1,5 mm de longueur) et des valves et
5 connecteurs multiprises Glenco selon l'ordre indiqué.

Les colonnes des séries 3500 Universal LC de Glenco sont garnies de suspensions de l'adsorbant défini en suspension dans le solvant indiqué à l'aide de techniques standards. Le vide entre le lit au repos et le haut du tube est rempli de sable Ottawa Standard. L'éluant est
10 pompé selon un débit maximum qui ne dépassera pas une contre-pression de 60 psi (environ 20 ml/mn).

Elution par gradient

Un appareil d'élution par gradient Glenco conformé de deux cham-
bres de volume, de hauteur et de diamètre égaux, relié en tandem avec
15 une vanne de téflon sont utilisés pour toutes les éluions par gradient. Une chambre est utilisée en tant que chambre de mélange et une en tant que réservoir statique. Le solvant le moins polaire est initialement maintenu dans la chambre de mélange. Le solvant le plus polaire est maintenu dans la chambre statique. Des barres d'agitation magnétique
20 revêtues de téflon (1,0 x 3,7 mm) sont placées dans les deux chambres et entraînées par un appareil d'entraînement des agitateurs de modèle 15 Magne-matic de Thomas. L'éluant est amené par pompe dans la chambre de mélange à la pression moyenne du système HPLC par un tube de polypropylène (1,5 mm de diamètre x 3,0 mm de longueur). Lorsque l'éluant est
25 éliminé de la chambre de mélange, le solvant du réservoir statique est autorisé à le remplacer librement, ce qui crée par conséquent un gradient linéaire de l'éluant.

Analyses TLC de BBM-1675 A₁ et A₂

Sont résumées dans le tableau 9 ci-dessous, les valeurs Rf obser-
30 vées pour BBM-1675 A₁ et A₂ sur des plaques en phase normale. Rf est calculé par division de la distance mesurée du centre d'une zone au point de l'introduction de l'échantillon par la distance mesurée du front de solvant au point d'introduction de l'échantillon.

TABLEAU 9

<u>Système/composé</u>	<u>Rf</u>	
	<u>BBM-1675 A1</u>	<u>BBM-1675 A2</u>
4% de méthanol dans le chloroforme	0,33	0,30
5% de méthanol dans l'éther diéthylique	0,39	-
50% d'acétone dans Skellysolve B	0,38	0,31

Sont résumées dans le tableau 10 ci-dessous, les valeurs Rf observées pour BBM-1675 A₁ et A₂ sur des plaques en phase normale développées en deux dimensions. Les positions des tâches sont exprimées en coordonnées cartésiennes. La coordonnée X est la valeur Rf du système de solvant de la deuxième liste. La coordonnée Y est la valeur Rf du système de solvant de la première liste.

TABLEAU 10

	Système/composé	Rf	
		BBM-1675 A1	BBM-1675 A2
10	4% de méthanol dans le chloroforme vs 5% de méthanol dans l'éther diéthylique	(0,34, 0,33)	(0,28, 0,23)
	4% de méthanol dans le chloroforme vs 50% d'acétone dans skellysolve B	(0,33, 0,28)	-

15 Sont résumées dans le tableau 11 ci-dessous, les valeurs Rf observées pour BBM-1675 A₁ et A₂ en chromatographie en phase inverse C₁₈ sur des plaques développées dans des éluants binaires.

TABLEAU 11

	Système/composé	Rf	
		BBM-1675 A1	BBM-1675 A2
20	25% NaCl 0,5 M dans l'acétonitrile	0,18	0,21
	25% d'eau dans l'acétonitrile	0,00	0,00

25 Sont résumées dans le tableau 12 ci-dessous, les valeurs Rf observées pour BBM-1675 A₁ et A₂ en chromatographie en couche mince en phase inverse C₁₈ sur des plaques développées par des éluants ternaires.

TABLEAU 12

	Système/composé			Rf	
	Acétonitrile	Méthanol	NaCl 0,5 M	BBM-1675 A1	BBM-1675 A2
30	80%	10%	10%	1,00	1,00
	60%	10%	30%	0,57	0,50
	40%	30%	30%	0,32	0,22
	30%	50%	20%	0,44	0,33
	50%	30%	20%	0,62	0,54
35	40%	40%	20%	0,60	0,49
	50%	20%	20%	0,42	0,34
	60%	20%	20%	0,74	0,69

	Acétonitrile	Méthanol	Eau		
	40%	30%	30%	0,00	0,00
	Acétonitrile	Méthanol	NH ₄ OAc 0,1M		
	40%	30%	30%	0,32	0,22
5	Acétonitrile	Méthanol	NaH ₂ PO ₄ 0,1M		
	40%	30%	30%	0,00	0,00

Analyse HPLC de BBM-1675 A₁ et A₂

10 On procède à des essais sur BBM-1675 A₁ et BBM-1675 A₂ à l'aide d'éluants simple, binaire et tertiaire sur des colonnes de gel de silice en phase inverse C₁₈. Sont résumées dans les tableaux 13, 14 et 15 ci-dessous, les valeurs K' observées pour ces composées. Les valeurs K' sont calculées à l'aide de la formule suivante:

$$K' = \frac{TR - T_0}{T_0}$$

15 dans laquelle:

TR est la durée de rétention mesurée au moment de l'injection par rapport au sommet du pic; et

To est le temps de volume vide.

TABLEAU 13

20	Système/composé	K'	
		BBM-1675 A1	BBM-1675 A2
	Acétonitrile	a	a
	Tétrahydrofurane	a	a
	Méthanol	0,00	0,00

25 a = le composé n'est pas élué de la colonne.

TABLEAU 14

30	Système/composé	K'	
		BBM-1675 A1	BBM-1675 A2
	25% d'eau dans l'acétonitrile	a	a
	25% de méthanol dans l'eau	1,25	1,25

a = le composé n'est pas élué de la colonne.

TABLEAU 15

Eluants ternaires

35	Système/composé			K'	
	Acétonitrile	Méthanol	Eau	BBM-1675 A1	BBM-1675 A2
	40%	30%	30%	a	a

	Acétonitrile	Méthanol	NH ₄ OAc 0,1M		
	40%	30%	30%	1,7	3,0
	50%	20%	30%	3,8	6,5
	43,3%	23,3%	33,3%	6,1	b
5	42,5%	22,5%	35,0%	7,8	b
	41,5%	21,5%	37,0%	9,7	b

a = le composé n'est pas élué

b = n'est pas déterminé.

Propriétés biologiques des constituants BBM-1675

- 10 L'activité antimicrobienne des constituants BBM-1675 est déterminée vis-à-vis de diverses bactéries (gram-positives, gram-négatives et résistantes aux acides) et de champignons par la méthode connue de dilution deux fois en série dans l'agar. Le milieu d'agar nutritif est utilisé pour les bactéries gram-positives et gram-négatives et le milieu n° 1001
- 15 (3% de glycérol, 0,3% de L-glutamate de sodium, 0,2% de peptone, 0,31% de Na₂HPO₄, 0,1% de KH₂PO₄, 0,005% de citrate d'ammonium, 0,001% de MgSO₄ et 1,5% d'agar) pour les organismes résistants aux acides. Le milieu d'agar de Sabouraud est utilisé pour les champignons (fongis). Ainsi qu'il est montré dans le Tableau 16, chacun des six constituants
- 20 de BBM-1675 (A₁, A₂, A₃, A₄, B₁, B₂) montre un large spectre d'activité antimicrobienne. Les BBM-1675 A₁, A₂, A₃ et A₄ en particulier sont très actifs vis-à-vis des bactéries gram-positives.

TABLEAU 16

Activité antimicrobienne des constituants BBM-1675

25	Souche	MIC en mcg/ml					
		BBM-1675 A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	B ₁	B ₂
	S. aureus 209P	<0,0008	0,0063	0,0063	0,0125	0,012	0,0063
	S. aureus Smith	<0,0008	0,0031	0,0063	0,0125	0,012	0,012
	B. subtilis PCI 219	<0,0008	0,05	0,0125	0,0125	0,05	0,05
	M. luteus 1001	0,0016	0,0063	0,0125	0,0125	0,1	0,1
30	M. flavus	<0,0008	0,0016	0,0063	0,0125	0,1	0,1
	Mycobacterium 607	0,05	0,1	NT	NT	0,05	0,025
	E. coli NIHJ	0,1	0,8	1,6	3,1	0,8	0,8
	K. pneumoniae D11	0,4	0,8	1,6	3,1	0,8	0,8
	P. aeruginosa D15	0,8	1,6	1,6	3,1	3,1	3,1
	C. albicans IAM 4888	0,4	0,4	1,6	6,3	3,1	1,6
	C. neoformans	1,6	3,1	1,6	6,3	6,3	12,5

- 35 Un deuxième essai antimicrobactérien est effectué sur A₁ et A₂ purifiés (ainsi que préparés dans l'exemple 3 ci-dessous) et les constituants A₃ et A₄. Les données sont résumées ci-dessous.

Souche	MIC en mcg/ml			
	BBM-1675 A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
S. aureus 209P	<0,0008	0,0063	0,0063	0,012
S. aureus Smith	<0,0008	0,0031	0,0063	0,012
B. subtilis PCI 219	<0,0008	0,05	0,012	0,025
5 M. luteus 1001	0,0016	0,0063	0,012	0,05
M. flavus	<0,0008	0,0016	0,0063	0,012
Mycobacterium 607	0,05	0,1	0,16	0,16
E. coli NIHJ	0,1	0,8	1,6	3,1
K. pneumoniae D11	0,4	0,8	1,6	3,1
P. aeruginosa D15	0,8	1,6	3,1	3,1
B. fragilis A20928	0,2	1,6	0,2	0,4
10 C. difficile A21675	0,4	0,8	0,05	0,4
C. perfringens A9635	0,05	0,8	0,4	0,4
C. albicans IAM 4888	0,4	0,4	1,6	6,3
C. neoformans	1,6	3,1	1,6	6,3

L'activité de l'induction prophage dans les bactéries lysogènes E. coli W1709 (λ) est déterminée pour les constituants BBM-1675 conformément à la méthode de Lein et coll. décrite dans Nature 196: 783-784 (1962). Le comptage de la plaque est effectué sur des plaques d'agar contenant la matière du test (T) et des plaques témoins (C). Le rapport T/C pour les plaques supérieur à 3 est considéré comme significatif et l'activité d'induction lysogène (activité ILB) est exprimée en tant que la concentration inductive minimum du meilleur composé. Ainsi qu'il est montré dans le tableau 17, les constituants BBM-1675 présentent une activité ILB forte dans les bactéries lysogènes, ce qui suggère qu'ils puissent posséder une activité antitumorale.

TABLEAU 17

25		Activité d'induction lysogène des constituants BBM-1675	
	Antibiotique	MIC* (mcg/ml)	
	BBM-1675 A ₁	0,0063	
	BBM-1675 A ₂	0,0125	
	BBM-1675 A ₃	0,05	
30	BBM-1675 A ₄	0,10	
	BBM-1675 B ₁	0,10	
	BBM-1675 B ₂	0,20	

* concentration inductive minimum

L'activité antitumorale de BBM-1675 A₁ et A₂ est déterminée sur divers systèmes de tumeurs sur des souris. Les leucémie lymphocytaire P-388, leucémie lymphoïdique L-1210, mélanome mélanotique B16 et carcinome du poumon de Lewis sont implantés par voie intrapéritonéale chez des souris mâle BDF₁ selon une dose d'inoculum de 10⁶, 10⁵, 5 x 10⁵ et 10⁶ cellules par souris respectivement. Des doses graduées des composés testés sont administrées aux souris par voie intrapéritonéale 24 heures

après inoculation de la tumeur.

Les traitements sont effectués une fois le premier jour seulement, puis au premier, quatrième et septième (q3j x 3), une fois par jour pendant 9 jours (qj 1 à 9), et onze jours (qj 1 à 11). Les constituants A₃ et A₄ sont testés uniquement vis-à-vis de la leucémie P-388 par un q3j x 3 dû fait d'un manque de matière.

Les BBM-1675 A₁, A₂, A₃ et A₄ sont dissous dans une solution saline à 0,9% contenant 10% de diméthyl sulfoxyde et la chromomycine A₃ (Toyomycine, Takeda) est employée en tant que composé de référence dissoute dans une solution saline à 0,9%. La mort ou la survie des souris traités et non traités est quotidiennement enregistrée et la durée de survie moyenne (MST) est calculée pour chacun des groupes testés (T) et témoin (C). Une valeur T/C égal à ou supérieur à 125% indique qu'un effet antitumoral significatif est obtenu. Les résultats sont consignés dans le tableau 18 à 23. Les BBM-1675 A₁ et A₂ montrent une activité antitumorale extrêmement puissante vis-à-vis des leucémies P-388 avec une valeur T/C maximum de 160%. Elles sont approximativement 100 à 3 000 fois plus actives que la chromomycine A₃ en terme de dose efficace minimum. Les BBM-1675 A₃ et A₄ cependant sont moins actifs que le constituant A₁ ou A₂ vis-à-vis de la leucémie P-388 (tableau 19). Les BBM-1675 A₁ et A₂ sont également actives vis-à-vis de la leucémie L-1210 (tableau 21), les mélanomes B16 (tableau 22) et les carcinomes de poumons de Lewis (tableau 23). La toxicité de BBM-1675 A₁ et A₂ est déterminée chez des souris mâles ddY par administration intrapéritonéale ou intraveineuse; la BBM-1675 A₁ est environ dix fois plus toxique que la BBM-1675 A₂ (tableau 24). Les indices thérapeutiques des BBM-1675 A₁ et A₂ sont de 4 à 8 et de 8 à 20 fois supérieurs à ceux de la chromomycine A₃ respectivement, sur le système de la leucémie P-388 (tableau 25). Des deuxième essais sont effectués par administration intraveineuse de constituants de BBM-1675 à l'encontre des leucémies P-388 et L-1210 qui sont inoculées par voie intraveineuse à raison de 5×10^5 et 10^4 cellules par souris respectivement. Dans ces essais, on utilise l'adriamycine en tant qu'agent de référence, adriamycine que l'on dissout dans une solution à 0,9% saline et que l'on administre au premier, quatrième et septième jours. Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux 26 et 27. Les deux constituants A₁ et A₂ sont supérieurs à l'adriamycine pour ce qui concerne les valeurs T/C maximum, la dose efficace minimum et le domaine d'activité.

TABLEAU 18
Effet des constituants de BBM-1675 sur la leucémie P-388
(traitement du premier jour)

5	Dose par voie ip (mg/kg/jour*)	MST (jours)	T/C (%)	Variation	Survivants		
				moyenne de poids au 5ème jour (g)	jour 5	jour 45	
BBM-1675 A ₁	0,03	19,0	152**	-2,6	5/5	0/5	
	0,01	19,0	152**	-1,0	5/5	0/5	
10	0,003	18,0	144**	-1,0	5/5	0/5	
	0,001	20,0	160**	-1,4	5/5	0/5	
	0,0003	16,0	128**	0,0	5/5	0/5	
	0,0001	15,0	120	-0,2	5/5	0/5	
	0,00003	14,0	112	-0,2	5/5	0/5	
15	BBM-1675 A ₂	0,3	6,0	48	-3,8	3/5	0/5
	0,1	20,0	160**	-1,8	5/5	0/5	
	0,03	18,0	144**	-1,4	5/5	0/5	
	0,01	17,0	136**	-0,6	5/5	0/5	
20	0,003	17,0	136**	-0,4	5/5	0/5	
	0,001	16,0	128**	0,0	5/5	0/5	
	0,0003	15,0	120	0,0	5/5	0/5	
	0,0001	14,0	112	0,0	5/5	0/5	
25	Chromomycine A ₃	1	19,0	152**	-0,2	4/5	0/5
	0,3	17,0	136**	+0,6	5/5	0/5	
	0,1	16,0	128**	+0,8	5/5	0/5	
	0,03	14,0	112	0,0	5/5	0/5	
	0,01	14,0	112	-0,2	5/5	0/5	
30	Véhicule	-	12,5	-	+0,1	10/10	0/10

* jour 1, i.p. voie intrapéritonéale

** indique une activité antitumorale significative.

TABLEAU 19
Effet des constituants de BBM-1675 sur la leucémie P-388
 (jours de traitement 1, 4 et 7)

5	Dose par voie ip (mg/kg/jour*)	MST (jours)	T/C (%)	Variation moyenne de poids au 5ème jour (g)	Survivants		
					jour 5	jour 45	
	BBM-1675 A ₁	0,03	7,0	56	-2,8	5/5	0/5
		0,01	19,0	152**	-1,0	5/5	0/5
10		0,003	19,0	152**	-0,6	5/5	0/5
		0,001	16,0	128**	-0,4	5/5	0/5
		0,0003	17,0	136**	-0,4	5/5	0/5
		0,0001	16,0	128**	-0,2	5/5	0/5
		0,00003	14,0	112	+0,4	5/5	0/5
	15	BBM-1675 A ₂	0,3	tox.	-	-	2/5
		0,1	11,0	88	-1,0	5/5	0/5
		0,03	18,0	144**	-1,2	5/5	0/5
		0,01	18,0	144**	-0,4	5/5	0/5
20			0,003	18,0	144**	-0,4	5/5
		0,001	17,0	136**	-0,4	5/5	0/5
		0,0003	16,0	128**	-0,4	5/5	0/5
		0,0001	16,0	128**	-0,2	5/5	0/5
		0,00003	15,0	120	-0,4		
25	BBM-1675 A ₃	0,01	17,5	140**	+0,2	4/4	0/4
		0,001	15,0	120	+0,6	4/4	0/4
		0,0001	13,5	108	+0,6	4/4	0/4
30	BBM-1675 A ₄	0,01	16,5	132**	+0,2	4/4	0/4
		0,001	14,0	112	+0,4	4/4	0/4
		0,0001	12,5	100	+0,6	4/4	0/4
35	Chromomycine A ₃	0,3	18,0	144**	+0,6	5/5	1/5
		0,1	18,0	144**	+0,6	5/5	0/5
		0,03	17,0	136**	-0,2	5/5	0/5
		0,01	14,0	112	0,0	5/5	0/5
	Véhicule	-	12,5	-	+0,4	10/10	0/10

* jours 1, 4 et 7, par voie intrapéritonéale

** indique une activité antitumorale significative.

TABLEAU 20
Effet des constituants de BBM-1675 sur la leucémie P-388
 (traitement qd 1 à 9)

5	Dose par voie ip (mg/kg/jour*)	MST (jours)	T/C (%)	Variation moyenne de poids au 5ème jour (g)	Survivants		
					jour 5	jour 45	
BBM-1675 A ₁	0,01	7,0	56	-1,8	5/5	0/5	
	0,003	13,0	104	-1,0	5/5	0/5	
	0,001	19,0	152**	-1,2	5/5	0/5	
	0,0003	19,0	152**	-0,8	5/5	0/5	
	0,0001	18,0	144**	0,0	5/5	0/5	
	0,00003	16,0	128**	+0,2	5/5	0/5	
10	0,00001	16,0	128**	-0,2			
	BBM-1675 A ₂	0,1	6,0	48	-2,2	4/5	0/5
		0,03	13,0	104	-1,4	5/5	0/5
		0,01	18,0	144**	-1,0	5/5	0/5
		0,003	18,0	144**	-0,6	5/5	0/5
		0,001	18,0	144**	-0,8	5/5	0/5
0,0003		17,0	136**	-0,4	5/5	0/5	
15	0,0001	16,0	128**	-0,4	5/5	0/5	
	0,00003	15,0	120	-0,6	5/5	0/5	
	0,00001	15,0	120	+0,4	5/5	0/5	
	20	Chromomycine A ₃	0,3	9,0	72	+2,0	5/5
0,1		18,0	144**	+0,4	5/5	0/5	
0,03		18,0	144**	0,0	5/5	0/5	
0,01		15,0	120	-0,2	5/5	0/5	
0,003		13,0	104	-0,2	5/5	0/5	
25	Véhicule	-	12,5	-	+0,4	10/10	0/10

* jour 1 à 9, par voie intrapéritonéale

** indique une activité antitumorale significative.

TABLEAU 21
Effet des constituants de BBM-1675 sur la leucémie L-1210

	Dose par voie ip (mg/kg/jour*)	MST (jours)	T/C (%)	Variation moyenne de poids au 5ème jour (g)	Survivants		
					jour 5	jour 45	
5	BBM-1675 A ₁	0,003	14,5	153**	-1,7	6/6	0/6
		0,001	12,0	126**	-0,5	6/6	1/6
		0,0003	12,0	126**	+0,3	6/6	0/6
10		0,0001	11,0	116	+1,0	6/6	0/6
	BBM-1675 A ₂	0,03	10,5	111	-1,5	6/6	0/6
15		0,01	13,5	142**	-1,2	6/6	0/6
		0,003	13,0	137**	-0,2	6/6	0/6
		0,001	11,0	116	+1,3	6/6	0/6
		0,0003	10,5	111	+1,0	6/6	0/6
20	Chromomycine A ₃	0,3	8,5	89	-1,2	6/6	0/6
		0,1	11,5	121	+1,2	6/6	0/6
		0,03	11,0	116	+1,2	6/6	0/6
		0,01	11,0	116	+1,3	6/6	0/6
		0,003	10,0	105	+1,5	6/6	0,6
25	Véhicule	-	9,5	-	+1,4	12/12	0/12

* jour 1 à 9, par voie intrapéritonéale

** indique une activité antitumorale significative.

30

35

TABLEAU 22

Effet des constituants de BBM-1675 sur le mélanome B16

	Dose par voie ip (mg/kg/jour*)	MST (jours)	T/C (%)	Variation		
				moyenne de poids au 5ème jour (g)	Survivants jour 5 jour 45	
5	BBM-1675 A ₁	0,003	10,0	61	-0,7	6/6 0/6
		0,001	31,5	191**	0,0	6/6 0/6
		0,0003	40,5	245**	+0,3	6/6 0/6
10		0,0001	27,0	164**	+0,8	6/6 0/6
		0,00003	22,0	133**	+1,8	6/6 0/6
		0,00001	18,0	109	+2,2	6/6 0/6
15	BBM-1675 A ₂	0,03	11,0	67	-0,8	6/6 0/6
		0,01	26,5	161**	+0,3	6/6 0/6
		0,003	29,5	179**	+0,2	6/6 0/6
		0,001	26,0	158**	+0,8	6/6 0/6
		0,0003	22,0	133**	+0,2	6/6 0/6
		0,0001	18,0	109	+0,2	6/6 0/6
20		0,00003	17,0	103	+1,7	6/6 0/6
25	Chromomycine A ₃	0,1	25,5	155**	+2,3	6/6 0/6
		0,03	23,0	139**	+2,2	6/6 0/6
		0,01	21,0	127**	+2,3	6/6 0/6
		0,003	18,0	109	+2,2	6/6 0,6
	Véhicule	-	16,5	-	+2,1	12/12 0/12

* jour 1 à 9, par voie intrapéritonéale

** indique une activité antitumorale significative.

30

35

TABLEAU 23

Effet des constituants de BBM-1675 sur le carcinome du poumon de Lewis

	Dose par voie ip (mg/kg/jour*)	MST (jours)	T/C (%)	Variation		
				moyenne de poids au 5ème jour (g)	Survivants jour 5 jour 45	
5	BBM-1675 A ₁	0,003	10,0	91	-1,7	5/6 0/6
		0,001	31,5	286**	-0,7	6/6 1/6
		0,0003	21,5	195**	-0,7	6/6 0/6
10		0,0001	21,0	191**	+1,0	6/6 0/6
		0,00003	13,0	118	+1,0	6/6 0/6
		0,00001	11,5	105	+1,0	6/6 0/6
15	BBM-1675 A ₂	0,03	10,0	91	-1,8	6/6 0/6
		0,01	25,5	232**	-1,7	6/6 0/6
		0,003	28,5	259**	0,0	6/6 1/6
		0,001	17,0	155**	-0,3	6/6 0/6
		0,0003	15,0	136**	+1,2	6/6 0/6
		0,0001	10,5	95	+0,5	6/6 0/6
20		0,00003	11,0	100	+0,8	6/6 0/6
25	Chromomycine A ₃	0,1	21,5	195**	+1,2	6/6 1/6
		0,03	17,0	155**	+1,7	5/5 0/5
		0,01	17,0	155**	+1,5	6/6 0/6
		0,003	11,5	105	+1,7	6/6 0,6
	Véhicule	-	11,0	-	+0,8	12/12 1/12

* jour 1 à 11, par voie intrapéritonéale

** indique une activité antitumorale significative.

30

35

TABLEAU 24
Toxicité des constituants de BBM-1675

5	<u>LD₅₀ (mg/kg/jour)</u>		
	<u>Dose simple</u>		<u>Doses multiples</u>
	<u>i.p.</u>	<u>i.v.</u>	<u>(qd 1 à 9)</u>
BBM-1675 A ₁	0,019	0,010	0,00046
BBM-1675 A ₂	0,18	0,10	0,0072
Chromomysine A ₃	0,81	0,41	0,23

10

TABLEAU 25
Indices thérapeutiques

15	<u>P-388</u>		<u>LD₅₀/MED*</u>	<u>L-1210</u>	<u>B16</u>	<u>LL</u>
	<u>simple</u>	<u>qd 1 à 9</u>				
	BBM-1675 A ₁	63	>46			
BBM-1675 A ₂	180	72	2	24	24	
Chromomycine A ₃	8	8	inactive	23	23	

* dose efficace minimum.

20

25

30

35

TABLEAU 26
Effet des constituants de BBM-1675 sur la leucémie P-388
implantée par voie intraveineuse

5	Dose (mg/kg/jour*)	MST (jours)	T/C (%)	Variation	Survivants	
				moyenne de poids au 5ème jour (g)	jour 5	jour 45
BBM-1675 A ₁	0,01	9,5	106	-1,7	6/6	0/6
	0,003	14,0	156**	-0,3	6/6	0/6
10	0,001	11,5	128**	+0,3	6/6	1/6
	0,0003	9,0	100	+0,3	6/6	0/6
BBM-1675 A ₂	0,1	7,0	78	-3,7	6/6	0/6
	0,03	15,0	167**	-1,0	6/6	0/6
15	0,01	12,0	133**	-0,5	6/6	0/6
	0,003	9,0	100	+1,0	6/6	0/6
Adriamycine	30	tox.	-	-	0/6	0/6
	10	9,0	100	-1,5	6/6	0/6
20	3	12,0	133**	+0,7	6/6	0/6
	1	9,0	100	+1,7	6/6	0/6
Véhicule	-	9,0	-	+1,7	12/12	0/12

* jour 1, 4 et 7, par voie intraveineuse.

25 ** indique une activité antitumorale significative.

30

35

TABLEAU 27
Effet des constituants de BBM-1675 sur la leucémie L-1210
implantée par voie intraveineuse

5	Dose (mg/kg/jour*)	MST (jours)	T/C (%)	Variation	Survivants	
				moyenne de poids au 5ème jour (g)	jour 5	jour 45
BBM-1675 A ₁	0,008	9,5	119	-2,0	4/6	0/6
	0,004	14,0	175**	-0,2	6/6	0/6
10	0,002	13,0	163**	+0,2	6/6	0/6
	0,001	9,5	119	+0,8	6/6	0/6
	0,0005	9,0	113	+0,8	6/6	0/6
BBM-1675 A ₂	0,063	11,0	138**	-1,8	6/6	0/6
	0,032	14,0	175**	+0,2	6/6	0/6
	0,016	10,5	131**	+0,8	6/6	0/6
	0,008	8,0	100	+1,2	6/6	0/6
	0,004	8,0	100	+0,8	6/6	0/6
20 Adriamycine	16	tox.	-	-	2/6	0/6
	8	12,0	150**	+0,2	6/6	0/6
	4	9,0	113	+1,5	6/6	0/6
	2	8,0	100	+1,7	6/6	0/6
25 Véhicule	-	8,0	-	+1,4	12/12	0/12

* jour 1, 4 et 7, par voie intraveineuse.

** indique une activité antitumorale significative.

L'activité antitumorale des constituants de BBM-1675 A₁ et A₂ est également déterminée par un deuxième essai vis-à-vis de la leucémie

30 P-388 de la leucémie L-1210 et du mélanome B16 chez les souris. Les résultats de ces essais sont montrés ci-dessous dans les tableaux 28, 29 et 30. Les détails des méthodes utilisées dans ces essais ont été décrits dans Cancer Chemother. Rep. 3: -87 (Part 3), 1972.

TABLEAU 28
Effet des BBM-1675 A₁ et A₂ sur la leucémie P-388

5	Matière	Programme de traitement	Dose, IP µg/kg/jour	MST jours	Effet	AWC,	Survivants jour 5 (30)			
					MST % T/C	g jour 5				
	*NSC 38270	qj 1 à 9	400	13,0	163	-0,6	6/6			
			200	11,0	138	-0,9	6/6			
10	BBM-1675A ₁ DMSO→saline	j 1	51,2	20,0	250	-2,1	4/6			
			25,6	18,0	225	-1,8	6/6			
			12,8	16,5	206	-1,1	6/6			
			6,4	13,0	163	+0,1	6/6			
			3,2	12,0	150	-0,3	6/6			
			1,6	11,0	138	-0,3	6/6			
15			0,8	10,5	131	0	6/6			
			0,4	10,0	125	+0,4	6/6			
			0,2	10,0	125	+0,3	6/6			
			0,1	10,0	125	0	6/6			
			20		j 1, 5 et 9	25,6	8,0	100	-1,8	6/6
						12,8	13,5	169	-1,5	6/6
6,4	16,5	206				-0,8	6/6			
3,2	16,0	200				-0,8	6/6			
1,6	15,5	194				+0,3	6/6			
0,8	12,5	156				+0,3	6/6			
25			0,4	12,0	150	-0,1	6/6			
			0,2	11,5	144	+0,2	6/6			
			0,1	12,0	150	+0,8	6/6			
			0,05	10,0	125	+0,8	6/6			
			30		qj 1 à 9	12,8	TOX	TOX	TOX	1/6
						6,4	6,0	75	-1,5	4/6
3,2	13,0	163				-1,2	6/6			
1,6	14,5	181				-1,6	6/6			
0,8	16,5	206				-2,3	6/6			
0,4	16,0	200				-0,9	6/6			
35			0,2	15,0	188	-0,8	5/5			
			0,1	13,0	163	-0,4	6/6			
			0,05	12,0	150	+0,1	6/6			
			0,025	12,0	150	-0,7	6/6			

	BBM-1674 A ₂	j 1	256	TOX	TOX	TOX	0/6	
	DMSO→saline		128	12,5	156	-3,5	4/6	
5			64	27,0	338	-1,9	6/6	
			32	26,0	325	-2,0	6/6	
			16	16,0	200	-1,8	6/6	
			8	15,5	194	-1,9	6/6	
			4	15,0	188	-0,7	6/6	
			2	12,0	150	-0,5	6/6	
10			1	12,0	150	0	6/6	
			0,5	10,0	125	+0,2	6/6	
		j 1, 5 et 9	128	TOX	TOX	TOX	0/6	
15			64	TOX	TOX	TOX	0/6	
			32	TOX	TOX	-1,3	2/6	
			16	24,5	306	-1,3	5/5	
			8	17,5	219	-1,1	6/6	
			4	15,0	188	0	6/6	
			2	15,0	188	+0,1	6/6	
20			1	12,5	156	-0,4	6/6	
			0,5	12,0	150	-0,4	6/6	
25	BBM-1675 A ₂							
	DMSO→saline		0,25	11,0	138	-0,4	6/6	
		dj 1 à 9	64	TOX	TOX	TOX	1/6	
			32	6,0	75	-2,9	4/6	
			16	8,0	100	-1,9	6/6	
			8	15,5	194	-1,3	6/6	
	30			4	17,0	213	-1,8	6/6
				2	15,0	188	-1,1	6/6
				1	14,0	175	-0,5	6/6
				0,5	14,0	175	-0,6	6/6
			0,25	12,0	150	-0,1	6/6	
35			0,125	12,0	150	+0,1	6/6	
	Témoïn		saline	8,0	-	+0,5	10/10	

Inoculum de la tumeur: 10^6 cellules d'ascites implantées par voie intrapéritonéale.

- hôte : souris CDF₁ °
 toxicité : < 4/6 souris vivantes au 5ème jour
 évaluation : MST = durée de survie moyenne
 effet : pourcentage T/C = (MST traité/MST témoin) x 100
 critère : pourcentage T/C \geq 125 considéré comme une
 activité antitumorale significative
 % NSC 38270 = olivomycine A.

TABLEAU 29

Effet des BBM-1675 A₁ et A₂ sur la leucémie L-1210

Matière	Programme de traitement	Dose, IP µg/kg/jour	MST jours	Effet	AWC,	Survivants jour 5 (30)
				MST % T/C	g jour 5	
BBM-1675A ₁	j 1	51,2	12,0	171	-1,1	5/6
		25,6	7,0	100	-2,3	6/6
		12,8	9,0	129	-1,1	5/6
		6,4	9,5	136	-0,5	6/6
		3,2	6,0	86	-1,7	6/6
		1,6	7,0	100	-0,8	6/6
		0,8	8,0	114	-0,4	6/6
		0,4	7,0	100	+0,3	6/6
		0,2	7,0	100	-0,5	5/6
		0,1	7,0	100	+0,8	5/6
	j 1, 5 et 9	25,6	TOX	TOX	TOX	1/6
		12,8	9,0	129	-1,8	6/6
		6,4	9,0	129	-0,8	6/6
		3,2	8,0	114	-1,9	6/6
		1,6	8,5	121	0	6/6
		0,8	8,0	114	-0,4	6/6
		0,4	7,5	107	-1,3	6/6
		0,2	8,0	115	0	6/6
		0,1	8,0	114	+0,4	5/6
		0,05	7,0	100	+0,3	6/6

	qj 1 ã 9	12,8	TOX	TOX	-2,4	3/6
		6,4	8,0	114	-1,6	6/6
		3,2	8,0	114	-1,7	6/6
		1,6	9,0	129	-2,1	6/6
5		0,8	8,5	121	-1,6	6/6
		0,4	8,0	114	-1,0	6/6
		0,2	8,0	114	-0,5	5/6
		0,1	7,0	100	+0,3	6/6
		0,05	7,0	100	+0,3	6/6
10		0,025	6,0	86	-0,6	6/6
	BBM-1674 A ₂ j 1	256	TOX	TOX	TOX	0/6
		128	7,0	100	-1,8	5/6
		64	7,5	107	-1,3	4/6
15		32	8,0	114	-2,2	5/6
		16	7,0	100	-2,3	6/6
		8	9,5	136	-1,4	6/6
		4	8,5	121	-1,1	6/6
		2	8,0	114	-0,8	6/6
20		1	8,0	114	0	6/6
		0,5	8,0	114	-0,1	6/6
25						
30						
35						

TABLEAU 30
Effet des BBM-1675 A₁ et A₂ sur le mélanome B16

				Effet	AWC,
	Dose, IP	MST	MST	g	Survivants
5	<u>Matière</u>	<u>µg/kg/jour</u>	<u>jours</u>	<u>% T/C</u>	<u>jour 5 (30)</u>
	BBM-1675 A ₁	3,2M	TOX	TOX	2/10
		1,6	16,0	64	10/10
		0,8	34,5	168	10/10
		0,4	56,5	226	10/10(2) ^b
10		0,2	47,0	188	10/10
		0,1	37,0	148	10/10
	BBM-1675 A ₂	16M	13,0	52	10/10
		8	29,5	118	10/10
15		4	43,5	174	10/10
		2	50,5	202	10/10(3) ^b
		1	0,5	140	10/10
		0,5	38,0	152	10/10
20	Témoin	saline	25,0	-	-0,1 10/10

^a seulement un sans tumeur; MST d.m.o. = 55,0 (220%)

^b deux sans tumeur; MST d.m.o. = 46,0 (184%).

25

Inoculum de la tumeur: 0,5 ml d'un bouillon à 10%, ip
hôte : souris BDF₁ °

traitement : qj 1 à 9

toxicité : < 7/10 des souris vivantes au 10^{ème} jour

30

évaluation : MST = durée de survie moyenne

effet : pourcentage T/C = (MST traité/MST témoin) x 100

critère : pourcentage T/C ≥ 125 considéré comme une
activité antitumorale significative

35

Après purification ultérieure de la BBM-1675 A₁ conformément à l'exemple 6, les échantillons du composé purifié sont testés vis-à-vis de la leucémie L-1210, la leucémie P-388 et le mélanome B16 chez les souris. Les résultats de ces essais sont donnés ci-dessous.

TABLEAU 31
Effet de la BBM-1675 A₁ sur la leucémie P-388

		(traitement au jour 1)				
					Moyenne	
	Dose, IP	Route	MST	T/C	variation	Survivants
	<u>µg/kg/jour</u>	<u>programme</u>	<u>jours</u>	<u>%</u>	<u>au 5è jour</u>	<u>au 5ème jour</u>
5	Matière					
	BBM-1675A ₁	i.p., qjx1	TOX	TOX		0/6
	0,1024		17,5	159	-1,8	4/6
	0,0512		16,5	150	-2,6	6/6
10	0,0256		17,5	159	-1,4	6/6
	0,0128		15,5	141	-2,2	6/6
	0,0064		15,5	141	-2,5	6/6
	0,0032		16,5	150	-1,0	6/6
	0,0016		15,0	136	-1,2	6/6
15	0,0008		15,0	136	-2,0	6/6
	0,0004					
	0,0256	i.p., q4jx3	TOX	TOX	-1,5	1/6
	0,0128		10,0	91	-2,5	5/6
	0,0064		17,5	159	-1,9	6/6
20	0,0032		17,0	155	-0,8	6/6
	0,0016		17,0	155	-2,0	6/6
	0,0008		15,0	136	-1,7	6/6
	0,0004		15,0	136	-0,4	6/6
	0,0002		13,0	118	-0,8	6/6
25	0,0001		13,0	118	-1,3	6/6
	0,00005		13,5	123	-1,0	6/6
	0,0128	i.p., qjx5	TOX	TOX		0/6
	0,0064		TOX	TOX	-3,6	3/6
	0,0032		17,5	155	-2,2	5/6
30	0,0016		14,5	132	-2,0	6/6
	0,0008		15,5	141	-2,2	6/6
	0,0004		16,0	145	-2,8	6/6
	0,0002		17,0	155	-1,3	6/6
	0,0001		14,0	127	-1,6	5/6
35	0,00005		15,0	136	-1,6	6/6
	0,000025		15,0	136	-1,0	6/6
Témoin						
véhicule	1 x 10 ⁶	i.p., d4jx3	11,0	100	-0,7	9/9

Hôte: souris femelle CDF1

niveau d'implant et site: 1 x 10⁶ cellules par voie intrapéritonéale.

TABLEAU 32
Effet de la BBM-1675 A₁ sur la leucémie L-1210
(traitement au jour 1)

					Moyenne	
	Dose, IP	Route	MST	T/C	variation	Survivants
	<u>µg/kg/jour</u>	<u>programme</u>	<u>jours</u>	<u>%</u>	<u>au 5^e jour</u>	<u>au 5^eme jour</u>
5	BBM-1675A ₁	i.p., qjx1	TOX	TOX		1/6
	0,1024		TOX	TOX	-2,0	0/6
	0,0512		8,0	114	-2,0	4/6
10			11,0	157	-2,0	6/6
	0,0128		11,0	157	-1,9	6/6
	0,0064		10,0	143	-2,0	6/6
	0,0032		10,0	143	-2,6	5/6
	0,0016		8,0	114	-0,4	6/6
15						
	0,0256	i.p., q4jx3	TOX	TOX	-2,3	2/6
	0,0128		10,5	150	-1,7	6/6
	0,0064		11,0	157	-1,8	6/6
20			11,0	157	-1,4	6/6
	0,0032		10,5	150	-1,9	6/6
	0,0016		9,0	120	-0,6	6/6
	0,0008		8,5	121	-0,7	6/6
	0,0004		8,0	114	-0,5	6/6
25						
	0,0128	i.p., qjx5	TOX	TOX	-2,8	2/6
	0,0064		7,0	100	-1,8	5/6
	0,0032		11,5	164	-1,0	6/6
	0,0016		11,0	157	-1,5	6/6
30			10,0	143	-1,6	5/6
	0,0008		8,5	121	-0,4	6/6
	0,0004		8,5	121	0,1	6/6
	0,0002		8,5	121	0,0	6/6
	0,0001					
35	Témoin véhicule	1 x 10 ⁶ i.p., d4jx3	7,0	100	0,1	10/10

Hôte: souris femelle CDF1

niveau d'implant et site: 1 x 10⁶ cellules par voie intrapéritonéale.

TABLEAU 33
Effet de la BBM-1675 A₁ sur le mélanome B16
(traitement au jour 1)

					Moyenne	
	Dose, IP	Route	MST	T/C	variation	Survivants
	<u>µg/kg/jour</u>	<u>programme</u>	<u>jours</u>	<u>%</u>	<u>au 5^e jour</u>	<u>au 5^eme jour</u>
5						
	*BBM-1675A ₁	i.p., q4jx3	16,5	110	-3,8	8/10
			22,5	150	-3,0	10/10
			25,0	167	-1,8	10/10
10			22,0	147	-2,3	10/10
			24,0	160	-1,8	9/10
		i.p., qjx9	27,0	180	-3,7	10/10
			27,0	180	-2,9	10/10
15			26,0	173	-2,3	10/10
			24,5	163	-2,4	10/10
			25,5	170	-2,3	10/10
	Témoin					
20	(véhicule)	0,5 ML i.p., qjx9	15,0	100	-0,3	10/10
	**BBM-1675A ₂	i.v., q4jx3	15,0	86	-4,7	10/10
			32,5	186	-2,1	10/10
			26,0	149	-1,4	10/10
			24,0	137	-0,4	10/10
25			24,5	140	-0,0	10/10
		i.p., q4jx3	18,0	103	-2,7	10/10
			23,0	131	-1,4	10/10
			24,0	137	-0,7	10/10
30			25,5	146	-0,8	10/10
			21,5	123	-1,4	10/10
	Témoin					
	véhicule	0,2 Ml i.p., d4jx3	17,5	100	-0,4	10/10

35

Hôte: souris femelle CDF1

*niveau d'implant et site: 0,5ml bouillon à 10% par voie
intrapéritonéale.

**niveau d'implant et site: fragment, s.c.

Les données des tests ci-dessus indiquent que le constituant de
BBM-1675 A₁ purifié a pratiquement les mêmes propriétés antitumorales
que l'échantillon moins purifié préalablement testé. Le composé présente
une puissance extrêmement élevée car l'activité a été obtenue pour une
5 dose de 25 nanogrammes/kg sur un programme de 5 doses quotidiennes sur
la leucémie P-388 de la souris. Les essais sur des leucémies P-388 et
L-1210 ont montré que la BBM-1675 A₁ est efficace qu'elle soit
administrée comme injection unique au premier jour, au quatrième jour
après trois injections ou en dose quotidienne pendant 5 jours.
10 Vis-à-vis du mélanome B16, le composé est également efficace qu'il soit
administré par voie intraveineuse à des animaux portant des tumeurs
sous-cutanées ou par voie intrapéritonéale à des animaux portant des
tumeurs implantées par voie intratumorale. Cette propriété de transfert
pharmacologique efficace d'un médicament à une tumeur se trouvant en un
15 site distant est inhabituelle parmi les antibiotiques antitumoraux.

Ainsi qu'il est montré ci-dessus, les constituants BBM-1675 pré-
sentent une activité antimicrobienne puissante et sont par conséquent
utiles dans le traitement thérapeutique des mammifères et d'autres ani-
maux ayant des maladies infectieuses provoquées par de tels micro-orga-
20 nismes. En outre, les constituants peuvent être utilisés pour d'autres
applications classiques des agents antimicrobiens, telles que par exemple
la désinfection des appareils dentaires ou médicaux.

L'induction prophagique dans les bactéries lysogènes et l'activité
témoinnée vis-à-vis des tumeurs des souris montrent que les constituants
25 de BBM-1675 sont également utiles du point de vue thérapeutique pour
inhiber la croissance des tumeurs chez les mammifères.

La présente invention a par conséquent pour objet un procédé pour
le traitement thérapeutique d'un autre animal souffrant d'une infection
microbienne ou d'une tumeur maligne, qui consiste à administrer audit
30 animal ou hôte une quantité antimicrobienne ou une dose inhibitrice de
tumeur de BBM-1675 A₁, A₂, A₃, A₄, B₁ ou B₂ ou d'une composition pharma-
ceutique les contenant.

Selon un autre aspect, la présente invention a pour objet une
composition pharmaceutique qui comprend une quantité efficace du point
35 de vue antimicrobien ou de l'inhibition de tumeur de BBM-1675 A₁, A₂,
A₃, A₄, B₁ ou B₂ ou en association avec un diluant ou véhicule accepta-
ble du point de vue pharmacologique et inerte. Ces compositions peuvent
être mises sous n'importe quelle forme pharmaceutique convenable destinée
à une administration par voie parentérale.

Les préparations conformes à la présente invention pour l'administration parentérale incluent des émulsions, suspensions ou solutions aqueuses ou non aqueuses. Elles peuvent également être mises sous la forme de compositions solides stériles qui sont susceptibles d'être
5 dissoutes dans de l'eau stérile, dans une solution physiologique ou autre milieu d'injection stérile, immédiatement avant emploi.

Il conviendra de remarquer que les quantités préférées véritablement employées des antibiotiques BBM-1675 varieront en fonction du constituant particulier, de la formulation particulière, du mode d'application et du site tumoral et de la maladie particulière à traiter. De
10 nombreux facteurs qui modifient l'action du médicament sont pris en considération par l'homme de l'art, par exemple l'âge, le poids de l'hôte, le sexe, la diète, la durée d'administration, la voie d'administration, le taux d'excrétion, l'état de l'hôte, les combinaisons de
15 médicaments, la sensibilité à la réaction et la sévérité de la maladie. L'administration peut être effectuée en continu ou par étapes aux doses maximum tolérées. Les taux d'application optimum pour un jeu donné de conditions peuvent être déterminés par l'homme de l'art à partir des essais de détermination de doses classiques dans le cadre des données
20 ci-dessus.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et ne constituent en aucune façon une limitation de l'invention.

EXEMPLE 1

Fermentation de BBM-1675

25 Une souche d'Actinomadura n° H 964-92 est développée et maintenue sur une base d'agar contenant 1% d'extrait de malt, 0,4% de glucose, 0,4% d'extrait de levure, 0,05% de CaCO_3 et 1,6% d'agar. Une base d'agar bien développée est utilisée pour inoculer un milieu végétatif contenant
30 3% d'amidon soluble, 3% de levure sèche, 0,3% K_2HPO_4 , 0,1% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2% de NaCl et 0,1% de CaCO_3 , le pH étant ajusté à une valeur de 7,0 avant stérilisation. La culture végétative est incubée à 32°C durant 72 heures sur un agitateur rotatif (250 rpm) et 5 ml du bouillon de culture sont transférés dans un Erlenmeyer de 500 ml qui contient 100 ml du milieu de fermentation formé de 3% de molasse de
35 canne à sucre, de 1% d'amidon de maïs, de 1% de farine de poisson, de 0,1% de CaCO_3 et 0,005% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (pH 7,0 avant stérilisation). La

fermentation est mise en oeuvre à 28°C pendant 6 jours sur un agitateur rotatif. L'activité antibiotique dans le bouillon de culture est déterminée par diffusion d'agar sur disque de papier, le *Staphylococcus aureus* 209P constituant l'organisme de test. La puissance d'antibiotique

5 atteint un minimum d'environ 1 mcg/ml après 5 jours de fermentation.

La fermentation de la BBM-1675 est également effectuée dans des fermenteurs agités. Cinq cent millilitres d'inoculum tel que préparé ci-dessus, sont transférés dans un fermenteur de 20 l contenant 10 l de milieu de fermentation qui est formé des mêmes ingrédients que ceux qui

10 ont été utilisés pour la fermentation en récipient secoué. La fermentation est effectuée à 32°C avec un débit d'aération de 2 l/mn et une agitation de 250 tpm. Dans ces conditions, la production d'antibiotique atteint un maximum d'environ 0,9 mcg/ml après 68-76 heures de fermentation.

15 Les études de fermentation sont également effectuées dans des récipients de fermentation. Une culture de germe est effectuée pendant 4 jours à 30°C dans un Erlenmeyer contenant un milieu végétatif constitué de 3% d'amidon soluble, 3% de levure sèche, 0,3% de K_2HPO_4 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2% de NaCl et 0,1% de $CaCO_3$. La culture

20 de germe est inoculée dans un récipient de germe de 200 litres contenant 130 litres de milieu de germe présentant la même composition que ci-dessus et le récipient de germe est agité à 240 tr/mn à 30°C pendant 31 heures. La deuxième culture de germe est utilisée pour inoculer 3 ml de milieu de fermentation contenant 1% d'amidon de blé, 3% de molasse de

25 canne à sucre, 1% de farine de poisson, 0,005% de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ et 0,1% de $CaCO_3$. Le réservoir de production fonctionne à 28°C à raison de 164 tr/mn et avec un débit d'aération de 2 ml/mn. Le pH du bouillon de culture s'élève graduellement avec le développement de la fermentation et atteint une valeur de 7,7-7,8 après 170-180 heures lorsqu'un pic d'activité

30 antibiotique de 1,7 mcg/ml est obtenu.

EXEMPLE 2

Isolement et purification des constituants de BBM-1675

Le bouillon de fermentation récolté (3 000 litres, pH 7,8) est séparé en gâteau mycélien et surnageant à l'aide d'une centrifugeuse

35 Sharpless. Le gâteau mycélien est mis en suspension dans 1 600 litres de méthanol et le mélange est agité durant 1 heure. Les matières insolubles sont séparées par filtration et l'extrait méthanolique est concentré

sous vide à un volume de 43 litres. L'activité contenue dans le surnageant du bouillon est récupérée par extraction de portion de 1 000 litres de n-butanol. Les extraits de n-butanol et les extraits de méthanol concentré sont combinés et évaporés par voie azéotropique avec addition occasionnelle d'eau jusqu'à l'obtention de 20 litres d'une solution aqueuse dans laquelle se dépose la plus grande de l'activité antibiotique sous forme d'un solide huileux. Le solide est digéré dans 30 litres de méthanol et les insolubles sont éliminés par filtration. L'extrait méthanolique est alors concentré sous vide jusqu'à l'obtention d'une solution de 10 litres à laquelle on ajoute 40 litres d'acétate d'éthyle et 30 litres d'eau. Après agitation durant 30 minutes, la couche organique est séparée, séchée sur sulfate de sodium et évaporée sous vide jusqu'à l'obtention d'un volume de 4 litres. L'addition du concentrat dans 20 litres de n-hexane conduit à un solide jaune pâle formé du complexe BBM-1675 brut (90,14 g, puissance 55 mcg/ml). A la TLC, le complexe apparaît être formé d'un mélange de deux constituants majeurs BBM-1675 A₁ et A₂ et de quelques uns des constituants mineurs. Ils sont séparés et purifiés par chromatographie répétée que l'on met en oeuvre dans une enceinte refroidie pour empêcher toute détérioration.

Le complexe de BBM-1675 (20 g) est dissous dans 20 ml de méthanol et introduit dans une colonne de Sephadex LH-20 (diamètre 5,5 x 85 cm). La colonne est traitée par le méthanol et l'élution est surveillée par un bio-essai sur staphylococcus aureus 209P. Les éluats actifs sont combinés, concentrés sous vide et lyophilisés; on obtient ainsi un solide semi pur du complexe de BBM-1675 (4,19 g). Le solide est alors chromatographié sur une colonne de gel de silice (diamètre 5,0 x 50 cm) dans laquelle en tant qu'éluant est utilisé du chloroforme plus une quantité croissante (1 à 5% v/v) de méthanol.

Les éluats sont recueillis sur la base de l'activité antibactérienne (par rapport à S. aureus) et la TLC (SiO₂; CHCl₃-CH₃OH = 5/1 v/v) est concentrée sous vide. Après évaporation, de la BBM-1675 pratiquement homogène (rendement après évaporation 351 mg) est éluee tout d'abord à l'aide de 2% de méthanol dans le chloroforme puis un mélange de BBM-1675 A₂, A₃ et A₅ (507 mg) suivi d'un mélange de BBM-1675 B (310 g) avec du méthanol à 3% dans le chloroforme. Le solide de BBM-1675 A₁ est traité dans une colonne de Sephadex LH-20 (diamètre 2,0 x 80 cm) que l'on développe à l'aide de méthanol. Les fractions actives sont concentrées sous vide à sec et le solide résiduel est cristallisé dans le méthanol.

On obtient ainsi des plaques incolores de BBM-1675 pur (124 mg) (cette matière est la matière de départ de l'exemple 3A). Le complexe de BBM-1675 A₂, A₃ et A₄ est séparé par chromatographie sur une colonne de Bondapak C₁₈ (Waters, diamètre 3,0 x 50 cm). L'élution est effectuée à l'aide d'acétonitrile en solution aqueuse et les éluats bioactifs sont examinés par TLC (Merck, CH₃CN-H₂O silanisé * = 75/25 v/v) (* gel de silice en phase inverse C₁₈). Les constituants mineurs A₄ (33 mg) et A₃ (18 mg) sont élués avec succès dans cet ordre avec 20% d'acétonitrile suivi d'un autre constituant majeur A₂ (cette matière est la matière de départ de l'exemple 3B) à l'aide d'acétonitrile à 50%.

Le solide contenant les BBM-1675 B₁ et B₂ est chromatographié sur une colonne de gel de silice (diamètre 3,0 x 40 cm) à l'aide de chloroforme et de méthanol en tant qu'agents de développement. Les fractions actives éluées à l'aide de méthanol à 4% dans du chloroforme sont combinées et évaporées; on obtient ainsi la BBM-1675 B₁ pure (7 mg). Une autre fraction active est éluee avec une concentration de méthanol à 5%; après évaporation, elle permet d'obtenir la BBM-1675 B₂ (8 mg).

EXEMPLE 3

Autre purification de BBM-1675 A₁ et A₂

20 A. Purification de BBM-1675 A₁

Une colonne de 2,67 cm de diamètre x 75 cm de long est garnie à l'aide d'une suspension de gel de silice C₁₈ dans une phase octadécyl liée Baker (dimension particulière 40 microns) dans le méthanol. La colonne est reliée à un système de HPLC sous pression moyenne et équilibrée avec 1,5 litres d'un éluant formé de 41,6% d'acétonitrile, 21,6% de méthanol et 36,8% d'acétate d'ammonium 0,1M. De la BBM-1675 A₁ partiellement purifiée (100,5 mg) obtenue conformément à la procédure de purification de l'exemple 2 est dissoute dans 2 ml d'acétonitrile et introduite dans une boucle de l'échantillon. L'échantillon est amené par pompage dans la colonne. La colonne est éluee à l'aide de l'éluant ci-dessus de façon à permettre l'obtention de fractions de 87 ml. L'éluant est contrôlé à 254 nm et 340 nm. Les fractions 55 à 71 sont recueillies et subissent deux extractions successives à l'aide d'aliquots de 1 50 ml de chloroforme. Le chloroforme est évaporé à sec; on obtient ainsi 89,8 mg du résidu C.

Une colonne de Glenco de 1,5 cm de diamètre x 20 cm de long est garnie par une suspension formée de 12 g de gel de silice de Woelm (particules de 60 à 200 microns). Le résidu C est introduit dans la colonne

dans une solution chloroformique. La colonne est éluée à l'aide d'un gradient linéaire formé de 500 ml de chloroforme à 10% de méthanol dans le chloroforme, ce qui permet d'obtenir des fractions de 20 à 25 ml. Après analyse par TLC sur gel de silice, les fractions 6 à 9 sont recueillies, évaporées à sec; on obtient ainsi 73 mg du résidu D.

Une colonne de Glenco de 1,5 cm de diamètre x 20 cm est garnie à l'aide d'une suspension de 12 g de gel de silice de Woelm (particules de 63 à 200 microns) dans le Skellysolve B. Le résidu D est dissous dans environ 2 ml de CHCl_3 et introduit dans la colonne. La colonne est déplacée à l'aide de 25 ml de Skellysolve B. La colonne est alors éluée à l'aide de 500 ml d'un gradient linéaire de Skellysolve B pour recueillir des fractions de 25 à 28 ml dans le Skellysolve B contenant 60% d'acétone. Les fractions 19 à 23 sont recueillies et évaporées à sec; on obtient ainsi 65,6 mg de BBM-1675 A_1 pur.

Le résidu est homogène dans trois systèmes TLC (5% de méthanol dans le chloroforme; 5% de méthanol dans l'éther et 50% d'acétone dans Skellysolve B sur gel de silice) et HPLC (gel de silice C_{18} ; acétonitrile 41,5%/méthanol 21,5%/acétate d'ammonium 0,1% 37,0%).

Chromatographie par perméation de gel avec BBM-1675 A_1 purifié

Une colonne Pharmacia de 2,5 cm de diamètre x 45 cm est garnie à l'aide d'une suspension de Sephadex LH-20 dans le méthanol et son pH est ajusté de façon à ce que le lit chromatographique soit de 33,4 cm. De la BBM-1675 A_1 purifiée (environ 120 mg) est dissoute dans 2 ml de méthanol puis transféré dans un réservoir d'échantillon de 2,5 ml. L'échantillon est introduit dans la colonne et l'éluion est commencée à 1,5 ml/mn à l'aide de méthanol ce qui permet de recueillir dix fractions de 10 ml (collecteur de fractions Pharmacia Frac-100). L'éluant est contrôlé à 254 nm à l'aide d'un détecteur Isco UA-5. On constate que la BBM-1675 A_1 élue à $V_e/V_t = 0,79$ à $0,91$ (V_e = volume d'éluion; V_t = volume du lit).

B. Purification de la BBM-1675 A_2

Une colonne de Glenco de 2,65 cm de diamètre x 75 cm est garnie à l'aide d'une suspension de gel de silice C_{18} dans une phase octadécyl par Baker (dimension particulière 40 microns) dans le méthanol. La colonne est reliée au système HPLC à pression moyenne et équilibrée à l'aide de 1,5 litres d'éluant (50% d'acétonitrile, 20% de méthanol, 30% d'acétate d'ammonium 0,1M). De la BBM-1675 A_2 partiellement purifiée (76,9 mg) ainsi qu'obtenue par la procédure de l'exemple 2, est dissoute dans 2 ml d'acétonitrile et introduite dans la boucle d'échantillonnage.

L'échantillon est amené par pompage dans la colonne. La colonne est éluee à l'aide de l'éluant précité de façon à permettre de recueillir des fractions de 87 ml. L'éluant est contrôlé à 254 nm et 340 nm. Les fractions 31 à 38 sont stockées et subissent deux extractions successives
5 avec des aliquots de 500 ml de chloroforme. Le chloroforme est évaporé à sec; on obtient ainsi 65,8 mg de BBM-1675 A₂ homogène.

La BBM-1675 A₂ est homogène dans deux systèmes TLC, le système d'analyse TLC 2-j et par HPLC.

EXEMPLE 4

10 Procédé d'extraction préféré de la BBM-1675 A₁

Le jus brut de fermentation (6,8 l) obtenu conformément au procédé général de l'exemple 1 est transféré dans un récipient de polypropylène (12 cm de diamètre en haut, 10 cm de diamètre en bas, 37 cm de hauteur) pourvu d'un robinet en cuve. Un volume égal de chloroforme est
15 ajouté. Le mélange est agité à une bonne vitesse à l'aide d'un agitateur mù par l'air CRC pendant 2 heures. Environ 4 litres (1,3 kg) de Dicalite (adjuvant de filtration) sont ajoutés et on le laisse se mélanger à la masse. Le mélange est filtré sur un tampon de Dicalite que l'on a introduit dans un entonnoir de Buchner n° 12. Le filtrat est recueilli dans
20 une bouteille de solution de 19 litres pourvue d'un ajutage de mise sous vide (Ace n° 5396-06). La masse est lavée à l'aide de 2 l de chloroforme. Le filtrat est transféré dans une ampoule de séparation de 20 litres et les phases laissées se séparer. La phase inférieure (phase chloroformique) est enlevée.

25 Un tube de Glenco de 2,5 cm de diamètre x 40 cm de haut est rempli à l'aide d'une suspension de 91 g de gel de silice de Woelm (particules de 63 à 200 microns). A l'aide de la pompe FMI RPY-2CSD, la phase chloroformique précitée est introduite par pompage dans la colonne. La colonne est rincée avec 600 ml de chloroforme frais. Le chloroforme
30 formant l'éluant est rejeté. La colonne est alors éluee à l'aide de 600 ml de 10% de méthanol dans le chloroforme. Cet éluant est évaporé à sec; on obtient ainsi 547 mg du résidu A.

Le résidu A est dissous dans 50 ml de chloroforme. La solution de chloroforme est ajoutée à 20 g de Dicalite dans un récipient à fond rond
35 de 1 litre. Une suspension est formée par addition d'environ 200 ml de Skellysolve B. Les solvants sont éliminés dans un évaporateur rotatif. Le résidu est mis en suspension dans 300 ml de Skellysolve B. La suspension est introduite dans un tube de chromatographie du type Ace (partie

- n° B5872-14) (41 mm de diamètre x 45,7 cm) à l'aide de la procédure suivante. Un bouchon de laine de verre est inséré dans la gorge d'un robinet de blocage entre le robinet et le tube de la colonne. Une couche de 1 cm de sable d'Ottawa classique est ajoutée sur la laine de verre.
- 5 Le bouchon de blocage, la laine de verre et le lit de sable sont purgés d'air par passage d'un courant sous pression (5,7 psi, 0,40 bar) de Skellysolve B au travers de ces divers éléments. La suspension est alors introduite dans la colonne et on la laisse former un lit de garnissage sous le courant sous pression. On ne laisse jamais la colonne devenir
- 10 sèche. Lorsque l'on a obtenu un lit de colonne stable, une couche de 2 cm de sable d'Ottawa est ajoutée au sommet du lit. Le lit est alors élué à l'aide d'une quantité supplémentaire de 600 à 700 ml de Skellysolve B. Le lit est élué à l'aide de 500 ml de toluène. L'éluant que forme le toluène est évaporé à sec de façon à donner 93 mg du résidu B.
- 15 Cette BBM-1675 A₁ partiellement purifiée peut alors être éventuellement purifiée selon la procédure de l'exemple 3.

EXEMPLE 5

Fermentation du complexe BBM-1675 à l'aide du mutant H964-92-

A1327Y

- 20 Une souche de mutant A1327Y est obtenue par traitement à la NTG de l'Actinomadura Verrucosospora, souche n° H964-92, est utilisée pour inoculer un milieu végétatif contenant 2% d'amidon soluble, 1% de glucose, 0,5% d'extrait de levure, 0,5% de NB-amine type A et 0,1% de CaCO₃, le pH étant ajusté à une valeur de 7,0 avant stérilisation. La
- 25 culture végétative est incubée à 32°C durant 4 jours sur un agitateur rotatif (250 tr/mn) et 5 ml de la masse ainsi formée sont transférés dans un Erlenmeyer de 500 ml qui contient 100 ml de milieu de fermentation formé de 3% de molasse de canne à sucre, de 1% d'amidon de maïs, 1% de farine de poisson, 0,005% de CuSO₄.5H₂O, 0,05% de MgSO₄.7H₂O et
- 30 0,1% de CaCO₃, le pH étant ajusté à 7,0 avant stérilisation.

La fermentation est effectuée à 28°C pendant 7 jours sur un agitateur rotatif. La production d'antibiotique atteint un maximum d'environ 1,5 mcg/ml.

EXEMPLE 6

- 35 Isolement et purification des constituants de BBM-1675

Le bouillon de fermentation récolté dans l'exemple 5 (3 000 l, pH 7,6) est séparé en gâteau mycélien et surnageant par utilisation d'une centrifugeuse Sharpless. Le gâteau de mycelium est agité dans

2 000 litres de méthanol pendant 1 heure et les matières insolubles sont éliminées par filtration. L'activité contenue dans le surnageant du bouillon en est extraite à l'aide de 1 800 litres de n-butanol. Les extraits méthanolique et n-butanolique sont combinés et concentrés par
5 voie azéotropique avec addition éventuelle d'eau jusqu'à l'obtention de 20 litres d'une solution aqueuse, dans laquelle s'est déposée la plus grande partie de l'activité antibiotique sous forme d'un solide huileux. Le mélange est alors secoué à trois reprises avec 20 litres chaque fois d'acétate d'éthyle pour extraire l'activité. Les extraits sont
10 recueillis, filtrés pour éliminer les insolubles et évaporés sous vide jusqu'à un volume de 4 litres. L'addition du concentrat dans 30 litres de n-hexane sous agitation conduit à l'obtention d'un solide jaune pâle formé du complexe BBM-1675 brut (81,7 g, puissance 159 mcg/mg).
ar TLC et HPLC, le complexe apparaît comme étant formé d'un mélange de
15 deux constituants majeurs BBM-1675 A₁ et A₂ et de plusieurs constituants mineurs. Ils sont séparés et purifiés par une série de chromatographies qui sont mises en oeuvre dans une enceinte froide pour empêcher la détérioration.

Le complexe de BBM-1675 brut (20 g) est dissous dans 20 ml de
20 méthanol et introduit dans une colonne de Sephadex LH-20 (diamètre 5,5 x 85 cm). La colonne est développée à l'aide de méthanol et l'élution suivie par un bio-essai faisant emploi de *Staphylococcus aureus* 209P. Les éluats actifs sont recueillis, concentrés sous vide et lyophilisés; on obtient ainsi un solide semi-pur consistant en le complexe
25 BBM-1675 (4,86 g, puissance 203 mcg/mg). Le solide est alors chromatographié sur une colonne de gel de silice (diamètre 3,0 x 70 cm) à l'aide de chloroforme et une quantité croissante (1 à 5%) de méthanol en tant que solvant de développement. Les éluats sont recueillis sur la base de l'activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus* et subissent une TLC
30 (SiO₂, CHCl₃-MeOH = 5/1 v/v) et sont concentrés sous vide. La BBM-1675 A₁ (425 mg après évaporation, puissance 960 mcg/mg) est éluee tout d'abord à l'aide de 2% de méthanol dans le chloroforme puis d'un mélange de BBM-1675 A₂, A₃ et A₄ (732 mg, puissance 340 mcg/mg) suivi d'un complexe de BBM-1675 B (200 mg, puissance 190 mcg/mg) avec 3% de méthanol
35 dans le chloroforme. La BBM-1675 précitée est rechromatographiée sur un gel de silice (colonne diamètre 2,2 mm x 44 cm de longueur) à l'aide de 2% de méthanol dans du benzène. Les éluats bioactifs sont examinés par

HPLC (Lichrosorb RP-18: CH₃CN-MeOH-CH₃COONH₄ 0,1M = 5/2/3 v/v) et les fractions contenant les BBM-1675 A₁ homogène sont évaporées sous vide à sec. Le solide résiduel est cristallisé dans le méthanol (10 ml) pour donner des prismes incolores de BBM-1675 A₁ (197 mg, puissance
5 1 000 mcg/mg).

Le complexe de BBM-1675 A₂, A₃ et A₄ (537 mg) est séparé par chromatographie sur colonne de Bondapak C₁₈ (Waters, diamètre 2,0 x 42 cm). L'élution est effectuée à l'aide d'acétonitrile en solution aqueuse et les éluats bioactifs sont examinés par TLC (Merck,
10 CH₃CN silanisé - H₂O = 75/25 v/v). Les constituants majeurs BBM-1675 A₄ (45 mg, puissance 410 mcg/mg) et A₃ (19 mg, puissance 300 mcg/mg) sont élués successivement à l'aide de 20% d'acétonitrile suivi du constituant majeur BBM-1675 A₂ (203 mg) à l'aide d'acétonitrile à 50%. La fraction
15 de BBM-1675 A₂ est cristallisée dans le mélange chloroforme-n-hexane de façon à que se déposent des tiges incolores (70 mg, puissance 290 mcg/mg). Le solide contenant le mélange de BBM-1675 B est chromatographié sur une colonne de gel de silice (diamètre 3,0 x 40 cm) à l'aide de chloroforme et de méthanol en tant que solvants de développement. Les fractions actives éluées à l'aide de 4% de méthanol dans le chloroforme
20 sont recueillies et évaporées pour conduire à l'obtention de BBM-1675 B₁ pure (7 mg, puissance 180 mcg/mg). Une autre fraction active est éluee à l'aide d'une concentration de méthanol à 5% qui, après évaporation, conduit à BBM-1675 B₂ (8 mg, puissance 140 mcg/mg).

25

30

35

REVENDEICATIONS

1.- Antibiotique antitumoral BBM-1675 A₁ pratiquement sous forme pure et qui:

- (a) se présente sous forme de cristaux blancs à jaunes pâles;
- 5 (b) est soluble dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'éthanol et le méthanol, légèrement soluble dans le benzène et l'eau et insoluble dans le n-hexane et le tétrachlorure de carbone;
- 10 (c) donne une réaction positive avec le chlorure ferrique, les réactifs d'Ehrlich et de Tollen et une réaction négative aux tests de Sakaguchi, à la ninhydrine et à l'antrone;
- (d) conduit à un spectre d'absorption infrarouge (KBr) substantiellement semblable à celui de la figure 9;
- 15 (e) lorsqu'il est dissous dans CDCl_3 présente un spectre de résonance magnétique protonique substantiellement semblable à celui de la figure 10;
- (f) présente un point de fusion de l'ordre de 156 à 158°C;
- (g) présente une rotation optique $(\alpha)_D^{27} = -191^\circ$ (c 0,5, CHCl_3);
- 20 (h) présente un point moléculaire apparent, déterminé par spectroscopie de masse de 1 248;
- (i) présente une composition élémentaire approximative de:
- 52,17% de carbone,
6,15% d'hydrogène,
4,63% d'azote,
25 9,09% de soufre, et
27,96% (par différence) d'oxygène;
- (j) présente à la chromatographie en couche mince sur gel de silice avec le système de solvant CHCl_3 - CH_3OH (5/1 v/v) une valeur Rf de 0,74, et présente à la chromatographie en couche mince sur gel de silice en phase inverse une valeur Rf de 0,18 avec un système de solvant CH_3CN - H_2O (75/25 v/v);
- 30 (k) lorsqu'il est dissous dans le méthanol à une concentration de 0,01356 g/l présente les maximum d'absorption ultraviolette et absorptivités suivantes:

λ_{max} (nm)	adsorptivités
320	12,4
280	épaulement
253	25,1
210	25,5

sans modification significative lorsque l'on ajoute un acide ou une base;

- (l) présente une durée de rétention à la chromatographie liquide sous haute performance de 13,3 minutes sur une colonne de gel de silice en phase inverse C_{18} et avec le système de solvant formé de $CH_3CN-CH_3OH-CH_3COONH_4$ 0,1M (5/2/3 v/v);
- (m) est efficace pour inhiber la croissance de divers bactéries et champignons (fongis);
- (n) induit des prophages dans les bactéries lysogènes; et,
- (o) est efficace pour inhiber la croissance de la leucémie P-388, de la leucémie L-1210, du mélanome B16 et du carcinome du poumon de Lewis chez les souris.

2.- Antibiotique antitumoral BBM-1675 A_2 sous forme pratiquement purifiée qui:

- (a) est sous forme de cristaux blancs;
- (b) est soluble dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'éthanol et le méthanol, légèrement soluble dans le benzène et l'eau et insoluble dans le n-hexane et le tétrachlorure de carbone;
- (c) donne une réaction positive avec le chlorure ferrique, les réactifs d'Ehrlich et de Tollen et une réaction négative aux tests de Sakaguchi, à la ninhydrine et à l'anthrone;
- (d) présente un spectre d'absorption infrarouge (KBr) pratiquement semblable à celui de la figure 12;
- (e) lorsqu'il est dissous dans $CDCl_3$ présente un spectre de résonance magnétique protonique pratiquement semblable à celui de la figure 13;
- (f) présente un point de fusion de l'ordre de 147-149°C;
- (d) présente une rotation optique $(\alpha)_D^{27} = -179,4^\circ$ (c 0,5, $CHCl_3$);
- (h) présente un point moléculaire apparent tel que déterminé par spectroscopie de masse de 1 248;
- (i) présente une composition élémentaire approximative de:
- 52,17% de carbone,
- 5,94% d'hydrogène,
- 3,94% d'azote,
- 9,39% de soufre, et
- 28,01% (par différence) d'oxygène;

- (j) présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice pour le système de solvant $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (5/1 v/v) une valeur Rf de 0,71 et présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice en phase inverse avec le système de solvant $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (75/25 v/v) une valeur Rf de 0,21 ;
- (k) lorsqu'il est dissous dans le méthanol à une concentration de 0,02042 g/l présente les maximum d'absorption ultraviolette et absorptivités suivantes:

	λ_{max} (nm)	adsorptivités
10	320	12,2
	282	16,3
	282	26,2
	214	25,8

sans donner lieu à une modification significative après addition d'acide ou de base;

- (l) présente une durée de rétention en chromatographie liquide à performance élevée de 17,3 minutes pour une colonne de gel de silice en phase inverse C_{18} et le système de solvant formé de $\text{CH}_3\text{CN-CH}_3\text{OH-CH}_3\text{COONH}_4$ 0,1M (5/2/3 v/v);
- (m) est efficace pour inhiber la croissance de divers bactéries et champignons (fongis);
- (n) induit des prophages dans les bactéries lysogènes; et,
- (o) est efficace pour inhiber la croissance de la leucémie P-388, de la leucémie L-1210, le mélanome B16 et le carcinome du poumon de Lewis chez les souris.

3.- Antibiotique antitumoral BBM-1675 A_3 qui:

- (a) est soluble dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'éthanol et le méthanol, légèrement soluble dans le benzène et l'eau et insoluble dans le n-hexane et le tétrachlorure de carbone;
- (b) donne une réaction positive avec le chlorure ferrique, les réactifs d'Ehrlich et de Tollen et une réaction négative aux tests de Sakaguchi, à la ninhydrine et à l'anthrone;
- (c) présente un spectre d'absorption infrarouge (KBr) pratiquement semblable à celui de la figure 3;
- (d) lorsqu'il est dissous dans CDCl_3 présente un spectre de résonance magnétique protonique pratiquement semblable à celui de la figure 7;
- (e) présente un point de fusion de l'ordre d'environ 125-127°C;

- (f) présente une rotation optique $(\alpha)_D^{27} = -161^\circ\text{C}$ (c 0,5, CHCl_3);
- (g) présente une composition élémentaire approximative de:
- 54,55% de carbone,
6,46% d'hydrogène,
3,73% d'azote,
7,49% de soufre, et
27,77% (par différence) d'oxygène;
- (h) présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice avec le système de solvant $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (5/1 v/v) une valeur Rf de 0,72 et présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice en phase inverse avec le système de solvant $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (75/25 v/v) une valeur Rf de 0,28 ;
- (i) présente les maximum d'absorption ultraviolette lorsqu'ils sont dissous dans le méthanol, $\text{HCl-CH}_3\text{OH}$ 0,01N et $\text{NaOH-CH}_3\text{OH}$ 0,01 N suivants:
- | | |
|---|-------------|
| UV λ_{max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) | : 253 (286) |
| dans le méthanol | 282 (158) |
| | 320 (122) |
| | |
| UV λ_{max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) | : 253 (287) |
| dans $\text{HCl-CH}_3\text{OH}$ 0,01N | 282 (160) |
| | 320 (126) |
| | |
| UV λ_{max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) | : 252 (280) |
| dans $\text{NaOH-CH}_3\text{OH}$ 0,01N | 283 (162) |
| | 318 (120) |
- (j) présente une durée de rétention en chromatographie liquide à performance élevée de 8 minutes avec une colonne de gel de silice en phase inverse C_{18} et le système de solvant formé de $\text{CH}_3\text{CN-CH}_3\text{OH-CH}_3\text{COONH}_4$ 0,1M (5/2/3 v/v);
- (k) est efficace pour inhiber la croissance de divers bactéries et champignons (fongis);
- (l) induit des prophages dans les bactéries lysogènes; et,
- (m) est efficace pour inhiber la croissance de la leucémie P-388 chez les souris.

4.- Antibiotique antitumoral BBM-1675 A_4 qui:

- (a) est soluble dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'éthanol et le méthanol, légèrement soluble dans le benzène et l'eau et insoluble dans le n-hexane et le tétrachlorure de carbone;
- 5 (b) donne une réaction positive avec le chlorure ferrique, les réactifs d'Ehrlich et de Tollen et une réaction négative aux tests de Sakaguchi, à la ninhydrine et à l'anthrone;
- (c) présente un spectre d'absorption infrarouge (KBr) pratiquement semblable à celui de la figure 4;
- 10 (d) lorsqu'il est dissous dans CDCl_3 présente un spectre de résonance magnétique protonique pratiquement semblable à celui de la figure 7;
- (e) présente un point de fusion de l'ordre d'environ 123-127°C;
- (f) présente une rotation optique $(\alpha)_D^{27} = -176^\circ\text{C}$ (c 0,5, CHCl_3);
- 15 (g) présente une composition élémentaire approximative de:
- 54,65% de carbone,
6,29% d'hydrogène,
3,51% d'azote,
8,07% de soufre, et
- 20 27,48% (par différence) d'oxygène;
- (h) présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice avec le système de solvant CHCl_3 - CH_3OH (5/1 v/v) une valeur R_f de 0,71 et présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice en phase inverse avec le système de solvant CH_3CN - H_2O
- 25 (75/25 v/v) une valeur R_f de 0,78 ;
- (i) présente l'absorption ultraviolette maximum suivante lorsqu'il est dissous dans le méthanol, $\text{HCl-CH}_3\text{OH}$ 0,01N et $\text{NaOH-CH}_3\text{OH}$ 0,01 N suivants:
- 30
- | | |
|---|-------------|
| UV λ_{max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) | : 253 (257) |
| dans le méthanol | 282 (153) |
| | 320 (117) |
- 35
- | | |
|---|-------------|
| UV λ_{max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) | : 253 (258) |
| dans $\text{HCl-CH}_3\text{OH}$ 0,01N | 282 (155) |
| | 320 (118) |

UV λ_{\max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) : 252 (266)

dans NaOH-CH₃OH 0,01N 283 (160)

318 (118)

- 5 (j) présente une durée de rétention en chromatographie liquide à performance élevée de 5,1 minutes avec une colonne de gel de silice en phase inverse C₁₈ et le système de solvant formé de CH₃CN-CH₃OH-CH₃COONH₄ 0,1M (5/2/3 v/v);
- (k) est efficace pour inhiber la croissance de divers bactéries et
- 10 fongis;
- (l) induit des prophages dans les bactéries lysogènes; et,
- (m) est efficace pour inhiber la croissance de la leucémie P-388 chez les souris.

5.- Antibiotique antitumoral BBM-1675 B₁ qui:

- 15 (a) est soluble dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'éthanol et le méthanol, légèrement soluble dans le benzène et l'eau et insoluble dans le n-hexane et le tétrachlorure de carbone;
- (b) donne une réaction positive avec le chlorure ferrique, les réactifs d'Ehrlich et de Tollen et une réaction négative aux tests de
- 20 Sakaguchi, à la ninhydrine et à l'anthrone;
- (c) présente un point de fusion de l'ordre d'environ 159-161°C;
- (d) présente une rotation optique $(\alpha)_D^{27} = -171^\circ$ (c 0,5, CHCl₃);
- (e) présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice
- 25 avec le système de solvant CHCl₃-CH₃OH (5/1 v/v) une valeur Rf de 0,63 et présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice en phase inverse avec le système de solvant CH₃CN-H₂O (75/25 v/v) une valeur Rf de 0,23 ;
- (f) présente l'absorption ultraviolette maximum suivante lorsqu'il
- 30 est dissous dans le méthanol, HCl-CH₃OH 0,01N et NaOH-CH₃OH 0,01 N suivants:

UV λ_{\max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) : 253 (225)

dans le méthanol 282 (140)

320 (104)

35

UV λ_{\max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) : 253 (225)

dans HCl-CH₃OH 0,01N 282 (140)

320 (105)

UV λ_{\max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	: 252 (236)
dans NaOH-CH ₃ OH 0,01N	283 (141)
	318 (105)

- 5 (g) est efficace pour inhiber la croissance de divers bactéries et champignons (fongis);
- (h) induit des prophages dans les bactéries lysogènes.
- 6.- Antibiotique antitumoral BBM-1675 B₂ qui:
- 10 (a) est soluble dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'acétone, l'éthanol et le méthanol, légèrement soluble dans le benzène et l'eau et insoluble dans le n-hexane et le tétrachlorure de carbone;
- (b) donne une réaction positive avec le chlorure ferrique, les réactifs d'Ehrlich et de Tollen et une réaction négative aux tests de Sakaguchi, à la ninhydrine et à l'antrone;
- 15 (c) présente un point de fusion de l'ordre d'environ 156-159°C;
- (d) présente une rotation optique $(\alpha)_D^{27} = -122^\circ\text{C}$ (c 0,5, CHCl₃);
- (e) présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice avec le système de solvant CHCl₃-CH₃OH (5/1 v/v) une valeur Rf de 0,60 et présente en chromatographie en couche mince sur gel de silice en phase inverse avec le système de solvant CH₃CN-H₂O (75/25 v/v) une valeur Rf de 0,16;
- 20 (f) présente l'absorption ultraviolette maximum suivante lorsqu'il est dissous dans le méthanol, HCl-CH₃OH 0,01N et NaOH-CH₃OH 0,01 N
- 25 suivants:

UV λ_{\max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	: 248 (212)
dans le méthanol	279 (141)
	318 (103)

30 UV λ_{\max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	: 248 (210)
dans HCl-CH ₃ OH 0,01N	279 (140)
	318 (103)

35 UV λ_{\max} nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)	: 248 (233)
dans NaOH-CH ₃ OH 0,01N	278 (150)
	318 (110)

(g) est efficace pour inhiber la croissance de divers bactéries et fongis;

(h) induit des prophages dans les bactéries lysogènes.

7.- Procédé de production de l'antibiotique antitumoral BBM-1675 A₁ qui consiste à cultiver une souche productrice de BBM-1675 A₁ d'Actinomadura verrucosospora dans un milieu nutritif aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, dans des conditions aérobie submergées jusqu'à production d'une quantité substantielle de BBM-1675 dans ledit milieu de culture puis récupération de la BBM-1675 A₁ du milieu de culture.

8.- Procédé selon la revendication 7, dans lequel l'organisme producteur de BBM-1675 A₁ a les caractéristiques d'identification de l'Actinomadura verrucosospora, souche H964-92 (ATCC 39334), de l'Actinomadura verrucosospora souche A1327Y (ATCC 39638) ou d'un de leur mutants.

9.- Procédé de production de l'antibiotique antitumoral BBM-1675 A₂ qui consiste à cultiver une souche productrice de BBM-1675 A₂ d'Actinomadura verrucosospora dans un milieu nutritif aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, dans les conditions aérobiques submergées jusqu'à l'obtention d'une quantité substantielle de BBM-1675 dans ledit milieu de culture puis récupération de la BBM-1675 A₂ du milieu de culture.

10.- Procédé selon la revendication 9, dans lequel l'organisme producteur de BBM-1675 A₂ présente les caractéristiques d'identification de l'Actinomadura verrucosospora, souche H964-92 (ATCC 39334), de l'Actinomadura verrucosospora souche A1327Y (ATCC 39638) ou d'un de leur mutants.

11.- Procédé de production de l'antibiotique antitumoral BBM-1675 A₃ qui consiste à cultiver une souche productrice de BBM-1675 A₃ d'Actinomadura verrucosospora dans un milieu nutritif aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, dans les conditions aérobiques submergées jusqu'à l'obtention d'une quantité substantielle de BBM-1675 dans ledit milieu de culture puis récupération de la BBM-1675 A₃ du milieu de culture.

12.- Procédé selon la revendication 11, dans lequel l'organisme producteur de BBM-1675 A₃ présente les caractéristiques d'identification de l'Actinomadura verrucosospora, souche H964-92 (ATCC 39334), de l'Actinomadura verrucosospora souche A1327Y (ATCC 39638) ou d'un de leur mutants.

13.- Procédé de production de l'antibiotique antitumoral BBM-1675 A₄ qui consiste à cultiver une souche productrice de BBM-1675 A₄ d'Actinomadura verrucosospora dans un milieu nutritif aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, dans les conditions aérobiques submergées jusqu'à l'obtention d'une quantité substantielle de BBM-1675 dans ledit milieu de culture puis récupération de la BBM-1675 A₄ du milieu de culture.

14.- Procédé selon la revendication 13, dans lequel l'organisme producteur de BBM-1675 A₄ présente les caractéristiques d'identification de l'Actinomadura verrucosospora, souche H964-92 (ATCC 39334), de l'Actinomadura verrucosospora souche A1327Y (ATCC 39638) ou d'un de leur mutants.

15.- Procédé de production de l'antibiotique antitumoral BBM-1675 B₁ qui consiste à cultiver une souche productrice de BBM-1675 B₁ d'Actinomadura verrucosospora dans un milieu nutritif aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, dans les conditions aérobies submergées jusqu'à l'obtention d'une quantité substantielle de BBM-1675 dans ledit milieu de culture puis récupération de la BBM-1675 B₁ du milieu de culture.

16.- Procédé selon la revendication 15, dans lequel l'organisme producteur de BBM-1675 B₁ présente les caractéristiques d'identification de l'Actinomadura verrucosospora, souche H964-92 (ATCC 39334), de l'Actinomadura verrucosospora souche A1327Y (ATCC 39638) ou d'un de leur mutants.

17.- Procédé de production de l'antibiotique antitumoral BBM-1675 B₂ qui consiste à cultiver une souche productrice de BBM-1675 B₂ d'Actinomadura verrucosospora dans un milieu nutritif aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, dans les conditions aérobiques submergées jusqu'à l'obtention d'une quantité substantielle de BBM-1675 dans ledit milieu de culture puis récupération de la BBM-1675 B₂ du milieu de culture.

18.- Procédé selon la revendication 18, dans lequel l'organisme producteur de BBM-1675 B₂ présente les caractéristiques d'identification de l'Actinomadura verrucosospora, souche H964-92 (ATCC 39334), de l'Actinomadura verrucosospora souche A1327Y (ATCC 39638) ou d'un de leurs mutants.

19.- A titre de médicaments nouveaux pour le traitement d'un hôte animal affligé d'une infection microbienne, toute composition contenant

une dose efficace du point de vue antimicrobien de BBM-1675 A₁, de BBM-1675 A₂, de BBM-1675 A₃, de BBM-1675 A₄, de BBM-1675 B₁ ou de BBM-1675 B₂.

20.- A titre de médicaments nouveaux, toute composition pharmaceutique contenant une dose efficace du point de vue antimicrobien d'un ou plusieurs des BBM-1675 A₁, BBM-1675 A₂, BBM-1675 A₃, BBM-1675 A₄, BBM-1675 B₁ et BBM-1675 B₂ en association avec un support ou diluant ou véhicule pharmaceutiquement acceptable.

21.- A titre de médicaments nouveaux, toute composition pharmaceutique contenant une dose inhibitrice de tumeur efficace d'un ou plusieurs des BBM-1675 A₁, BBM-1675 A₂, BBM-1675 A₃, BBM-1675 A₄, BBM-1675 B₁ et BBM-1675 B₂ en association avec un support ou diluant ou véhicule pharmaceutiquement acceptable.

22.- Culture biologiquement pure du micro-organisme *Actinomadura verrucosospora* souche H964-92 (ATCC 39334), ladite culture étant capable de produire l'antibiotique BBM-1675 en une quantité récupérable, après ensemencement dans un milieu nutritif aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote.

23.- Culture biologiquement pure du micro-organisme *Actinomadura verrucosospora* souche A1327Y (ATCC 39638), ladite culture étant capable de produire l'antibiotique BBM-1675 en une quantité récupérable, après ensemencement dans un milieu nutritif aqueux contenant des sources assimilables de carbone et d'azote.

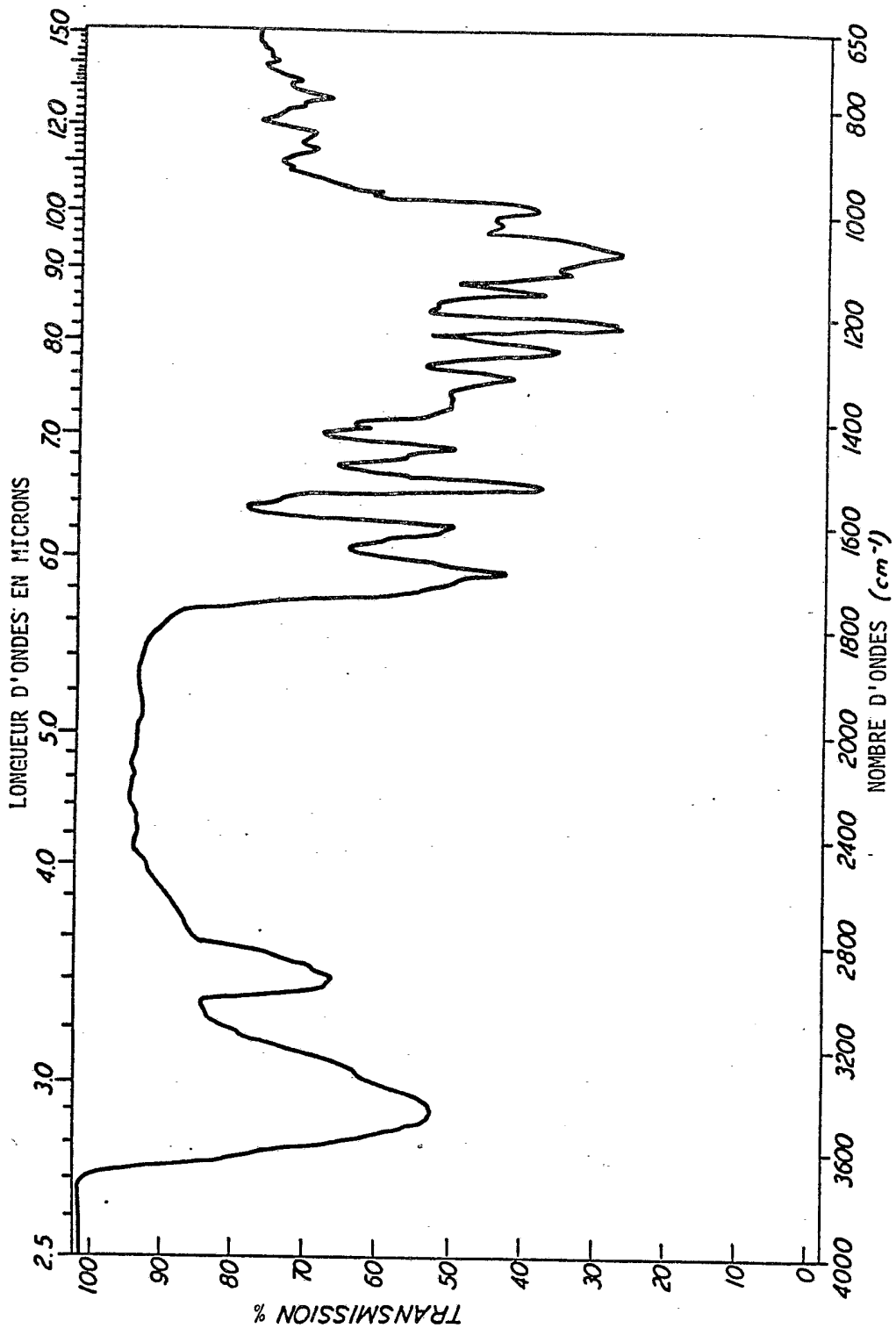
25

30

35

1/14

FIG. 1



2/14

FIG. 2

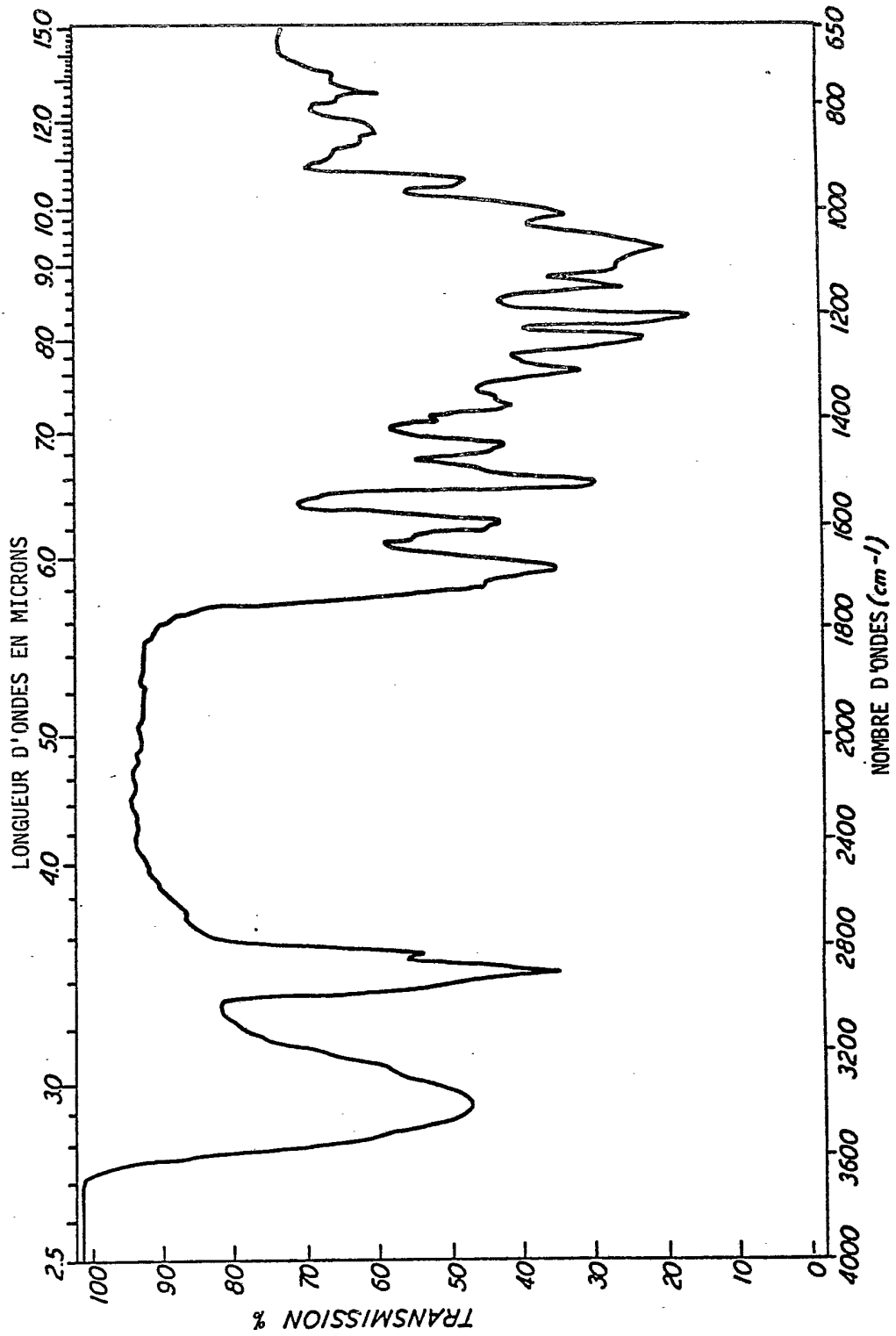


FIG. 3.

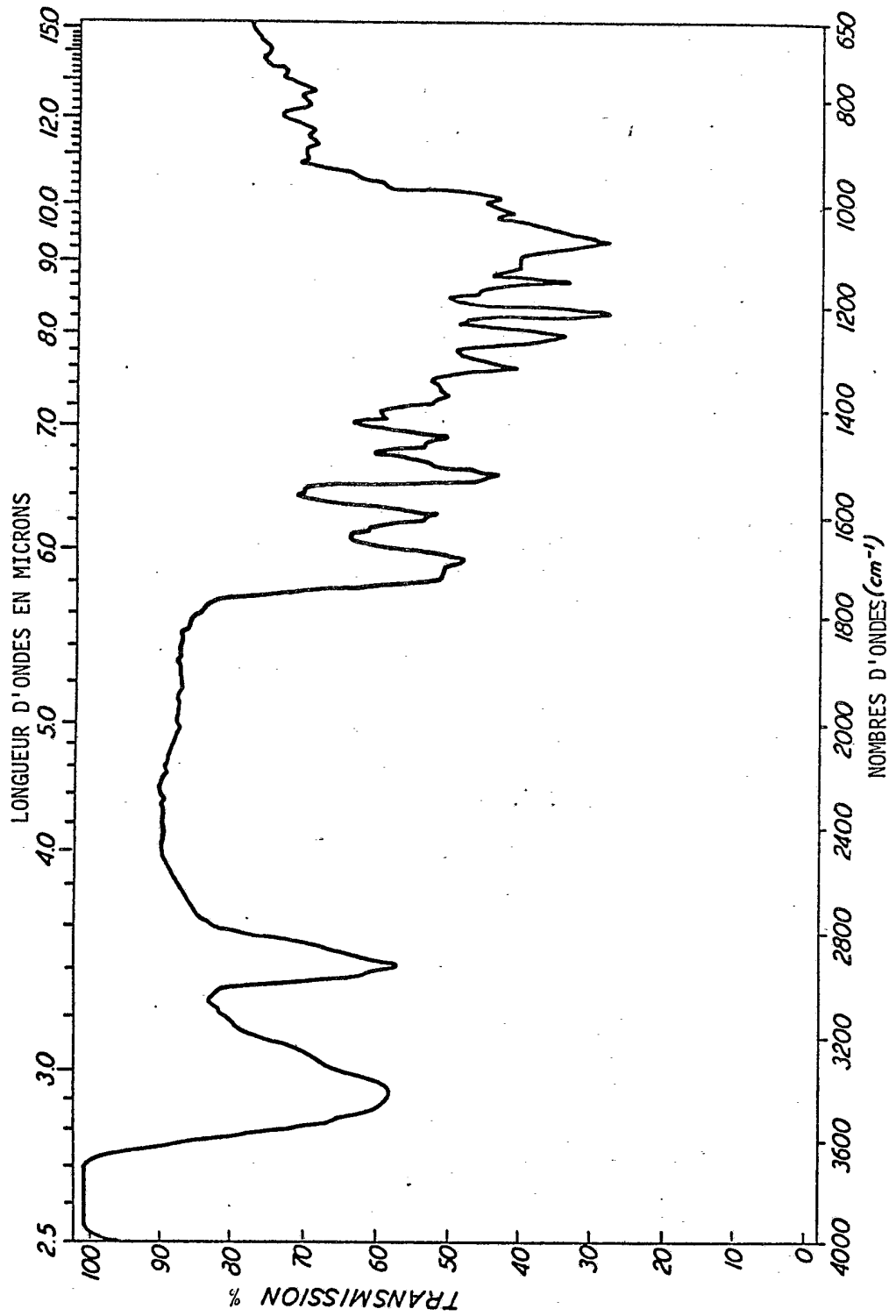
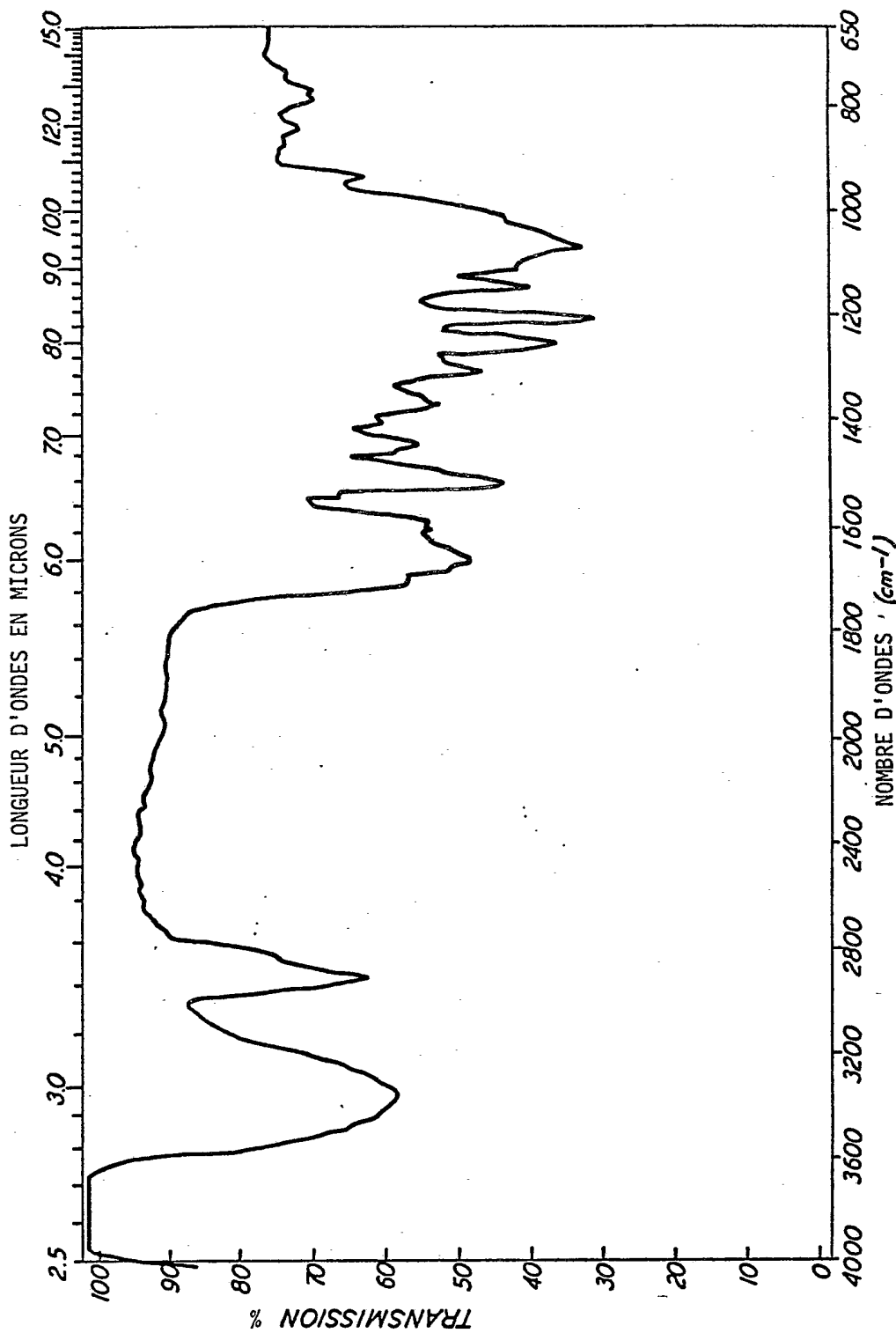


FIG. 4



5/14

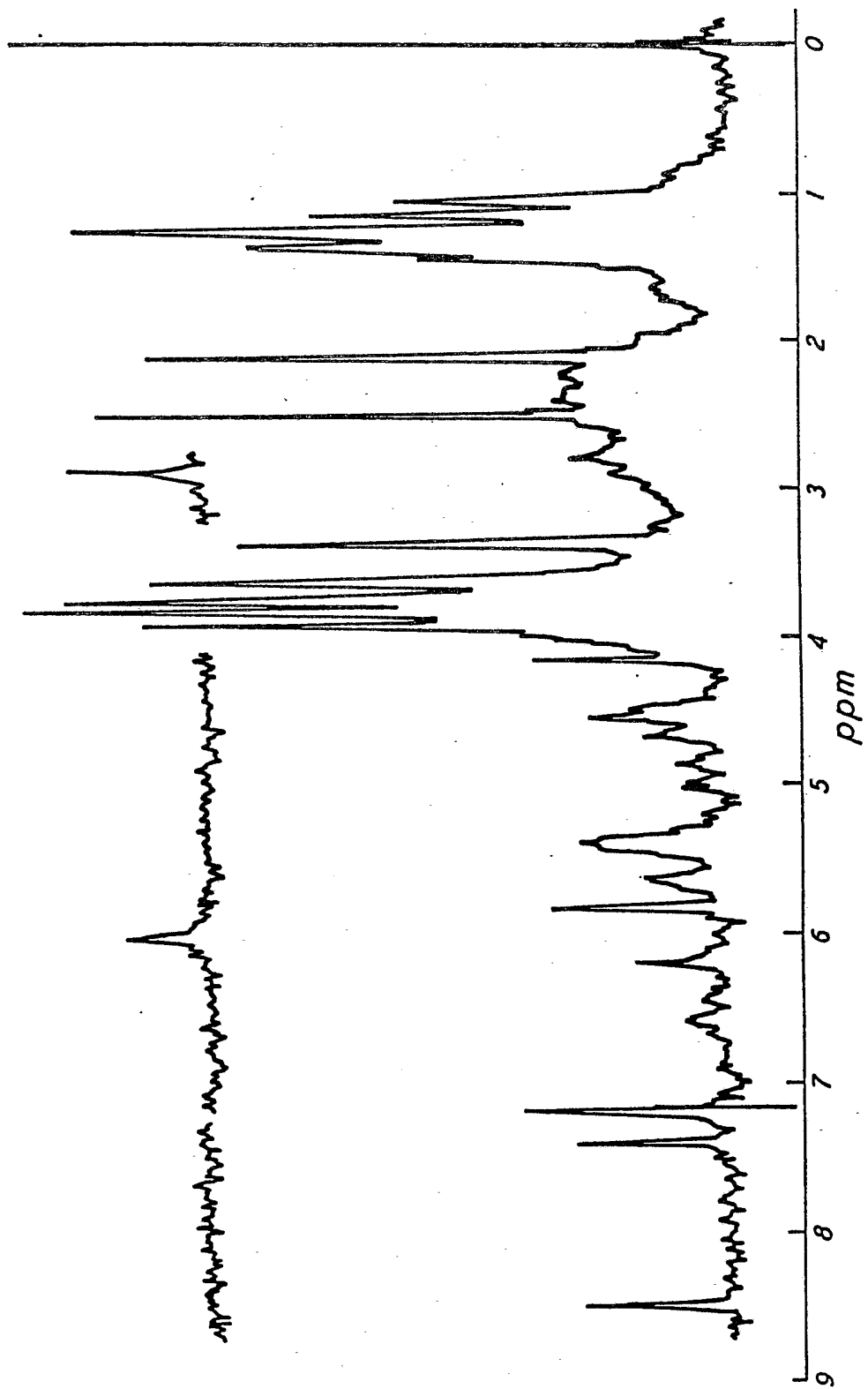
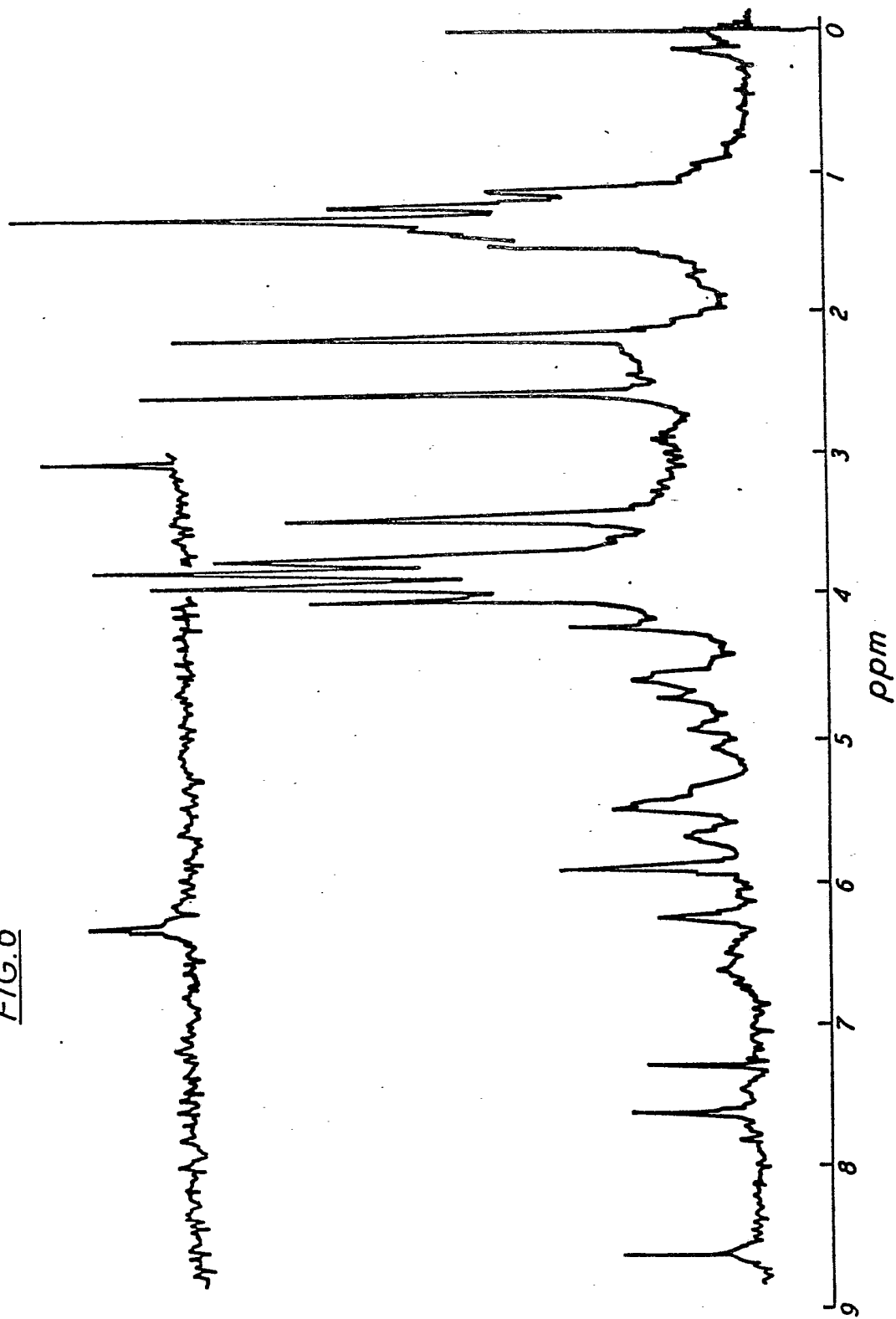


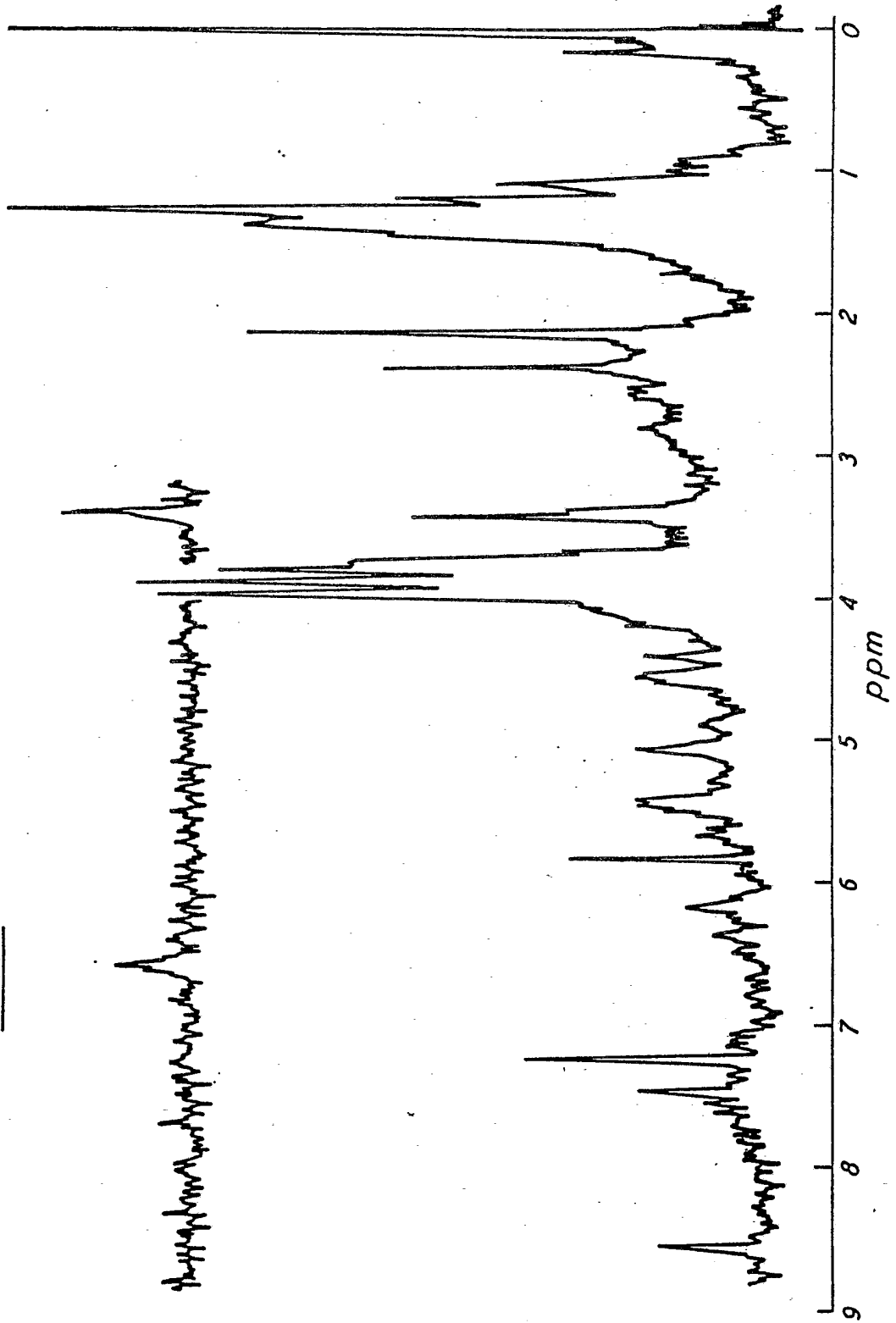
FIG. 5

FIG. 6



7/14

FIG. 7



8/14

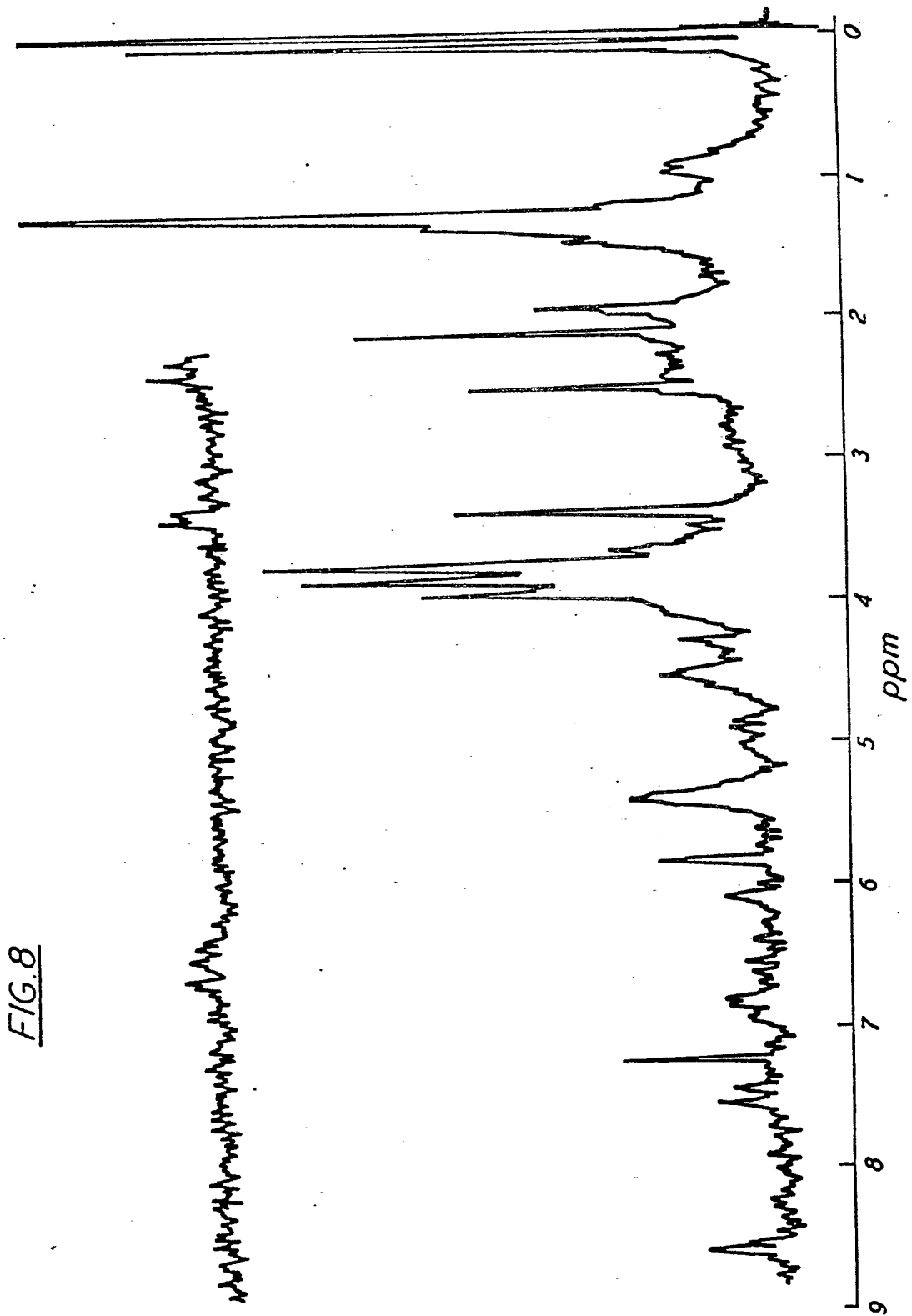
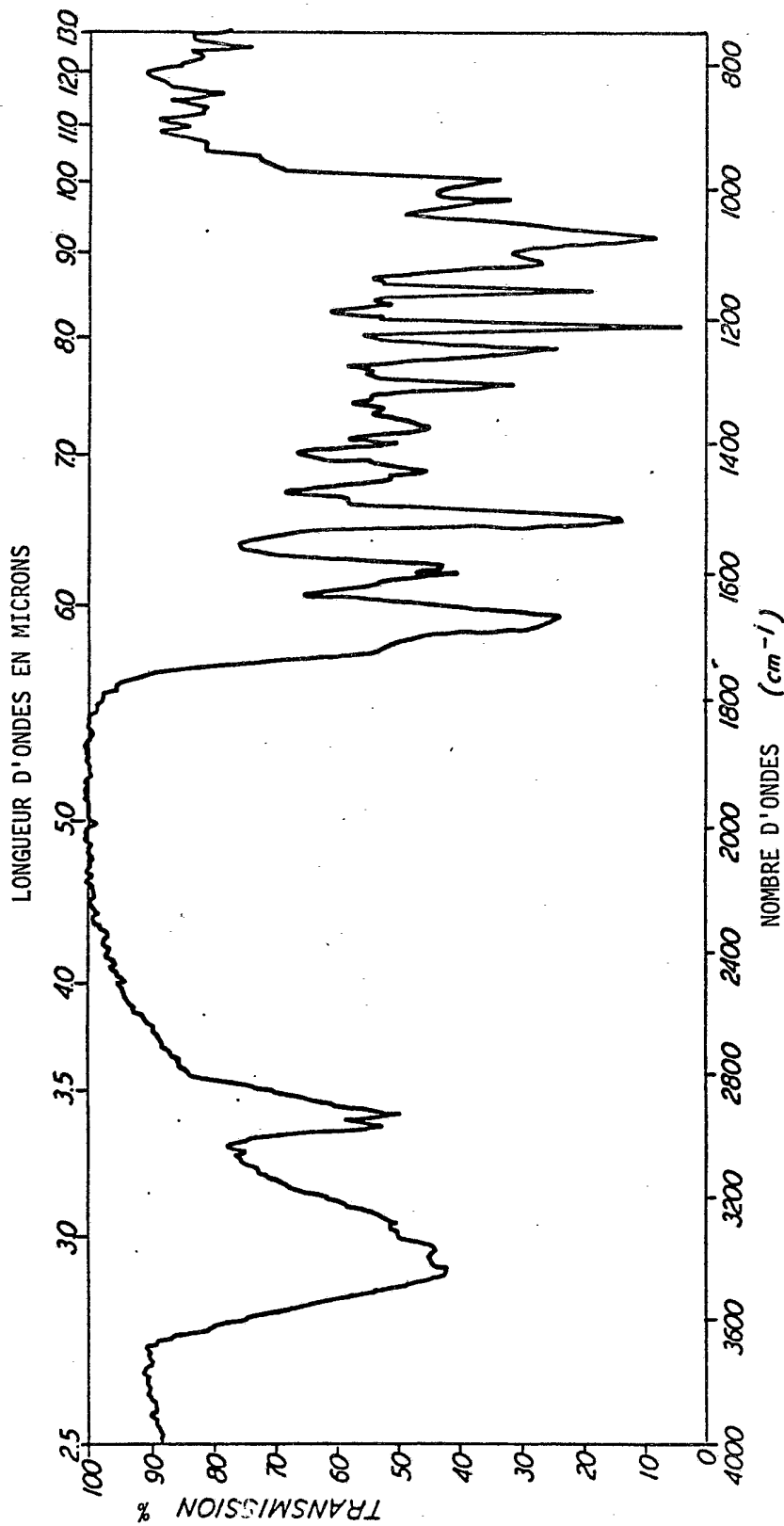


FIG. 8

9/14

FIG. 9.



10/14

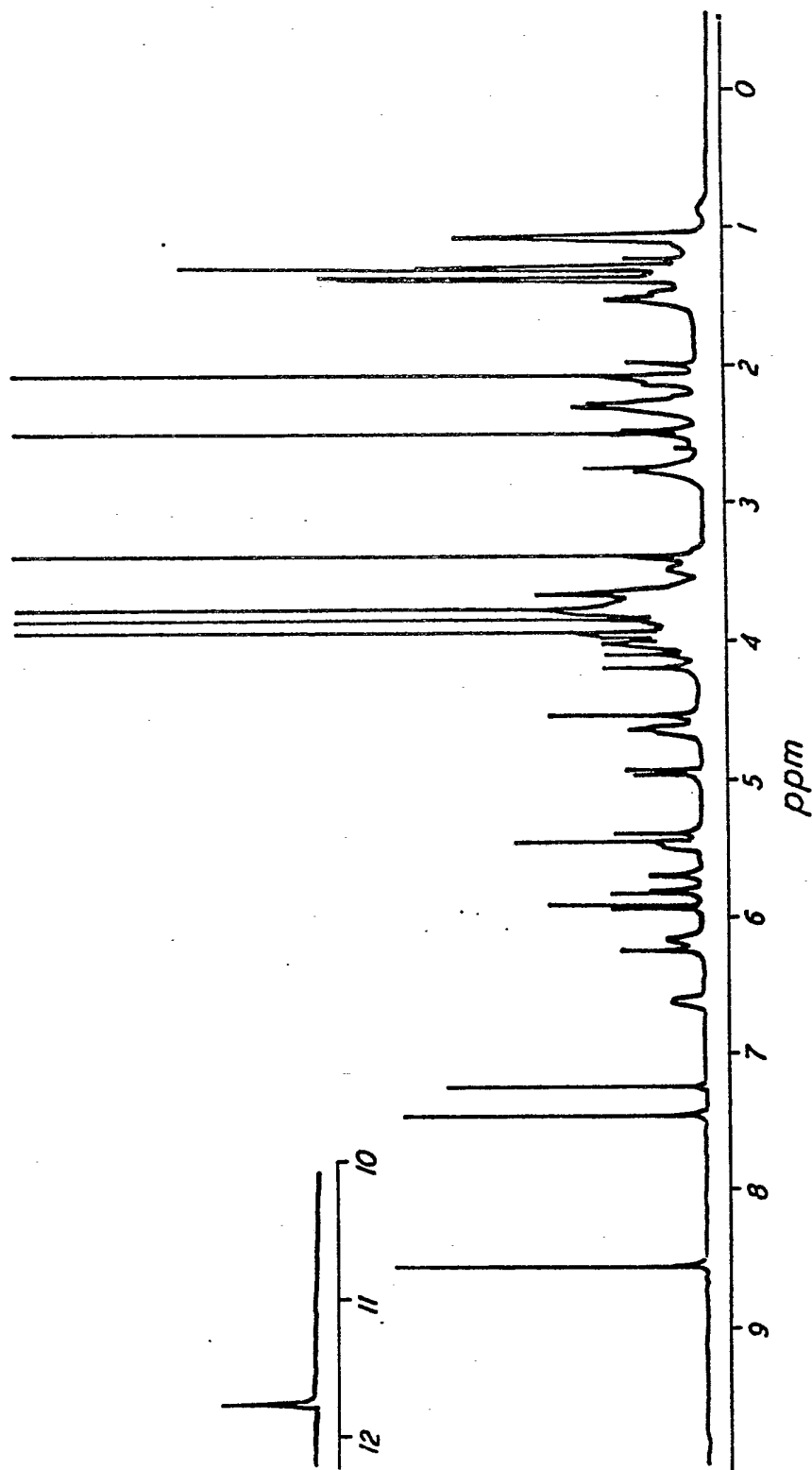
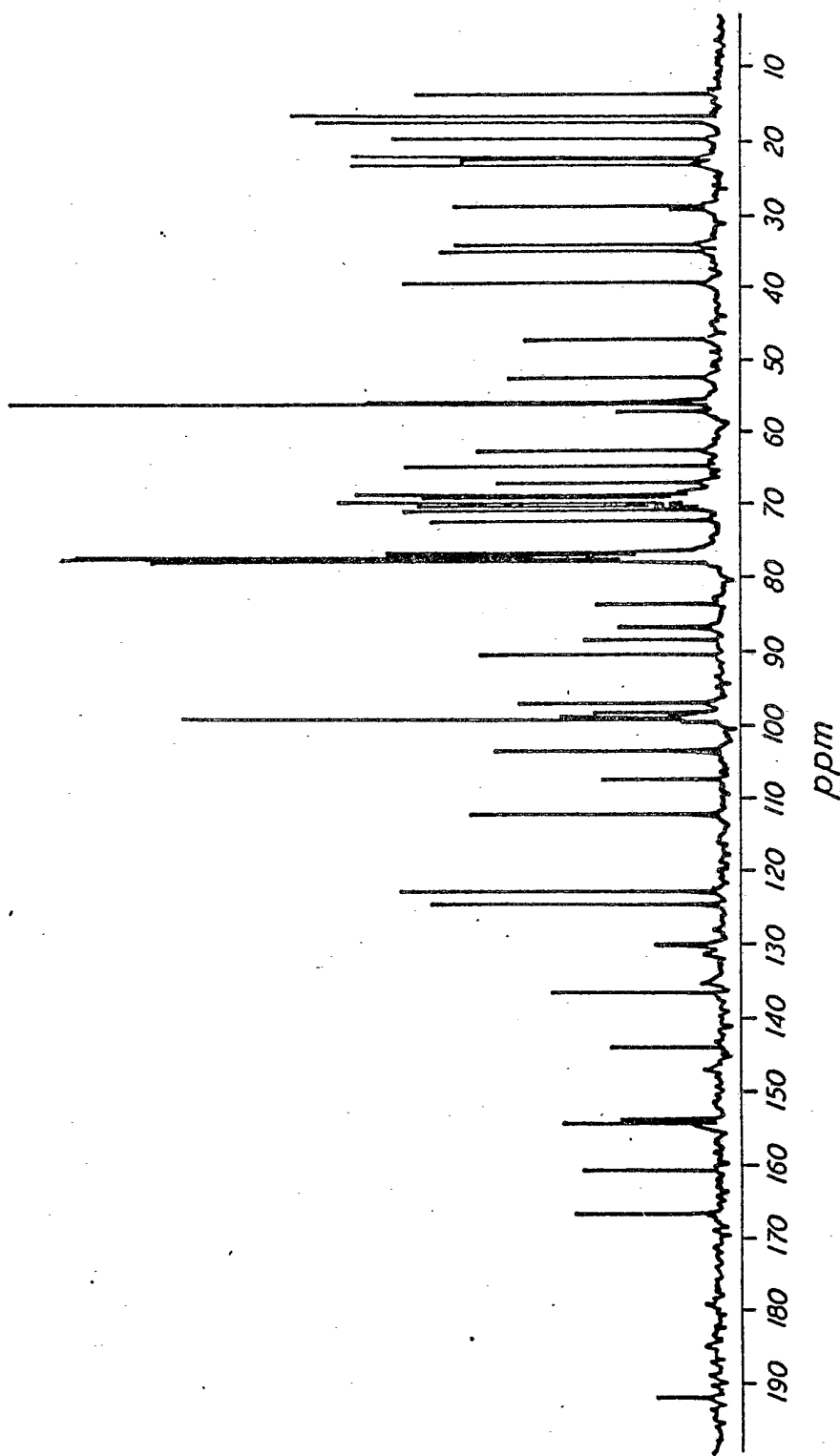


FIG. 10

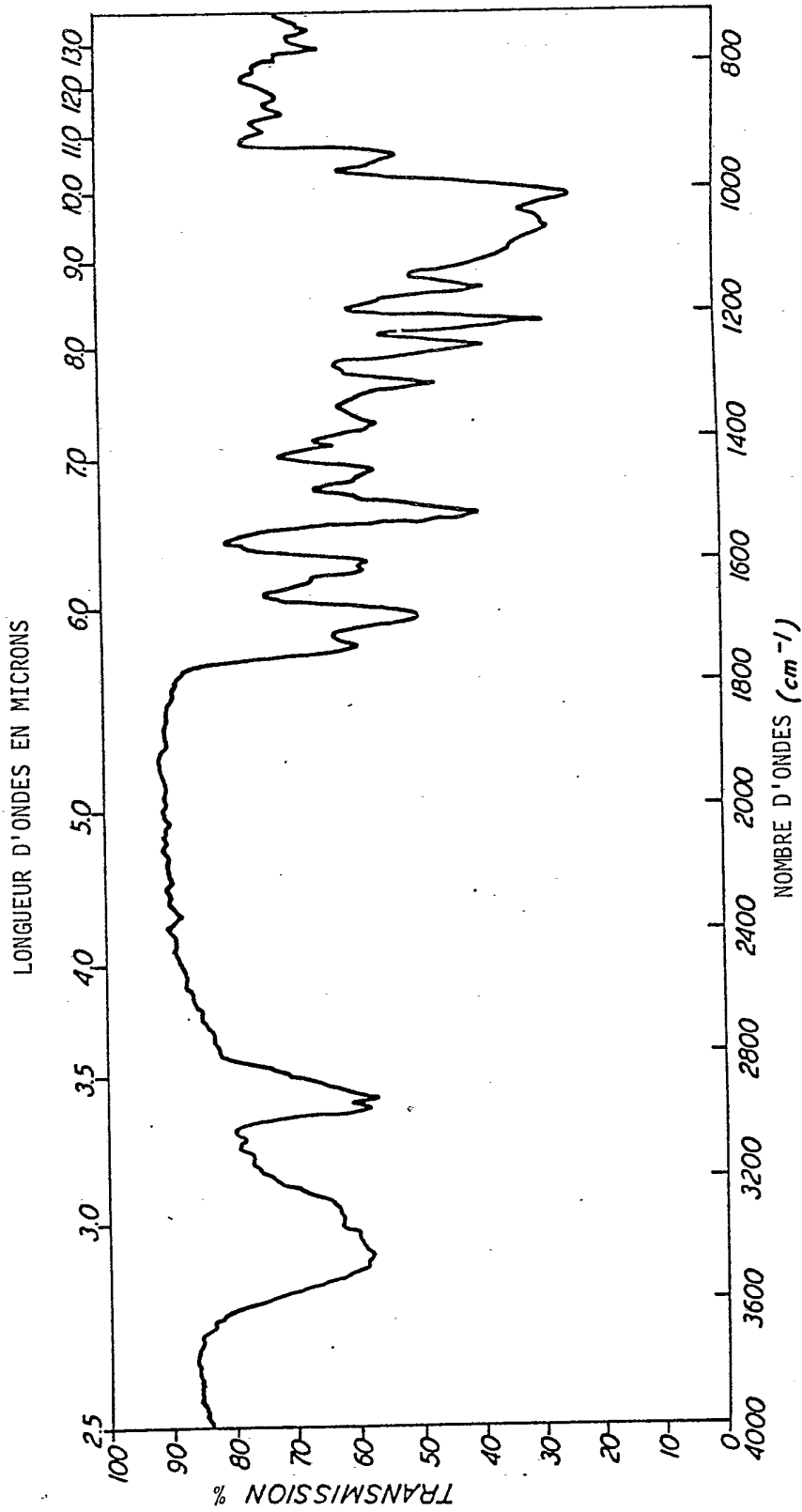
11/14

FIG. II



12/14

FIG. 12



13/14

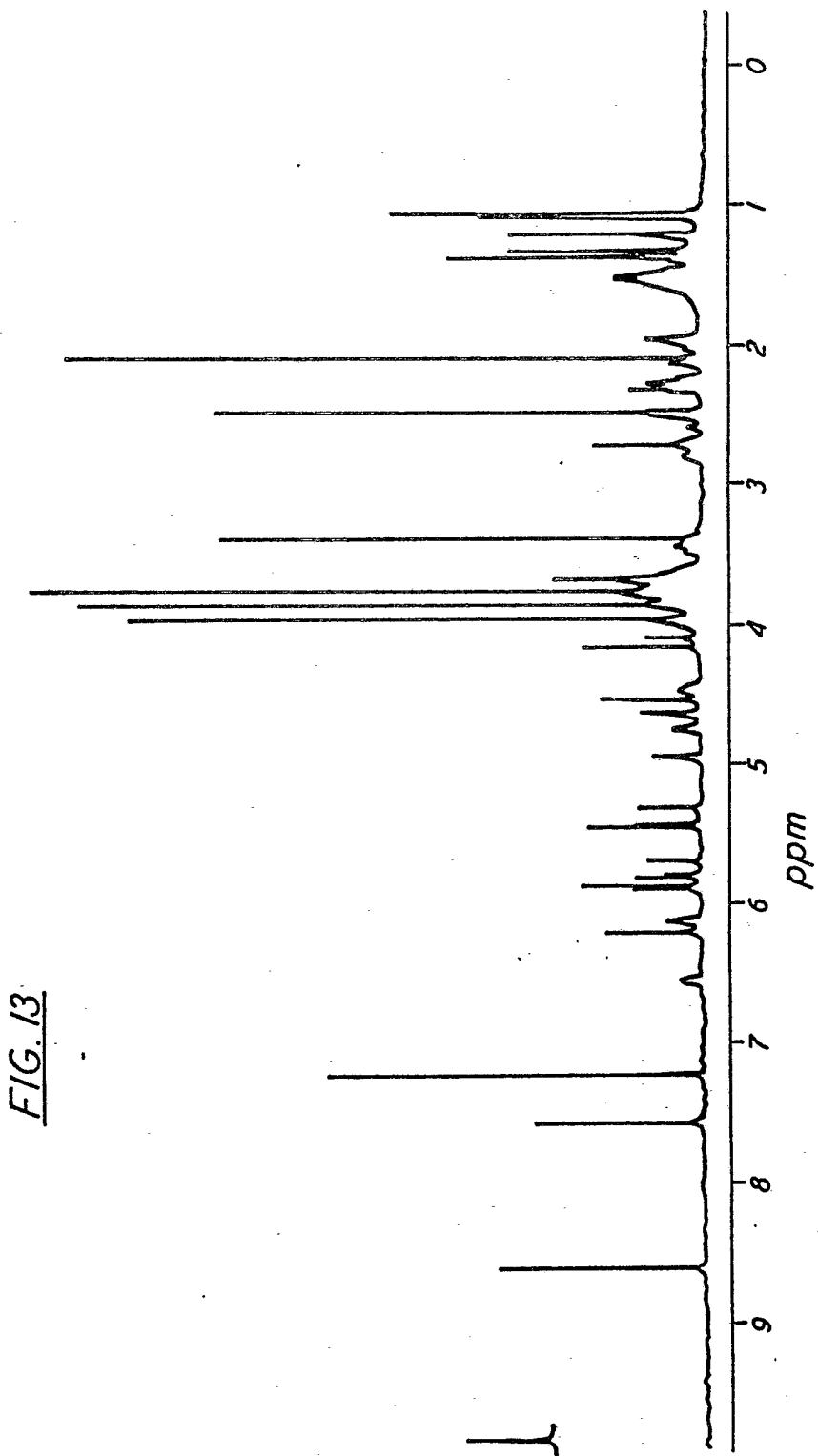


FIG. 13

14/14

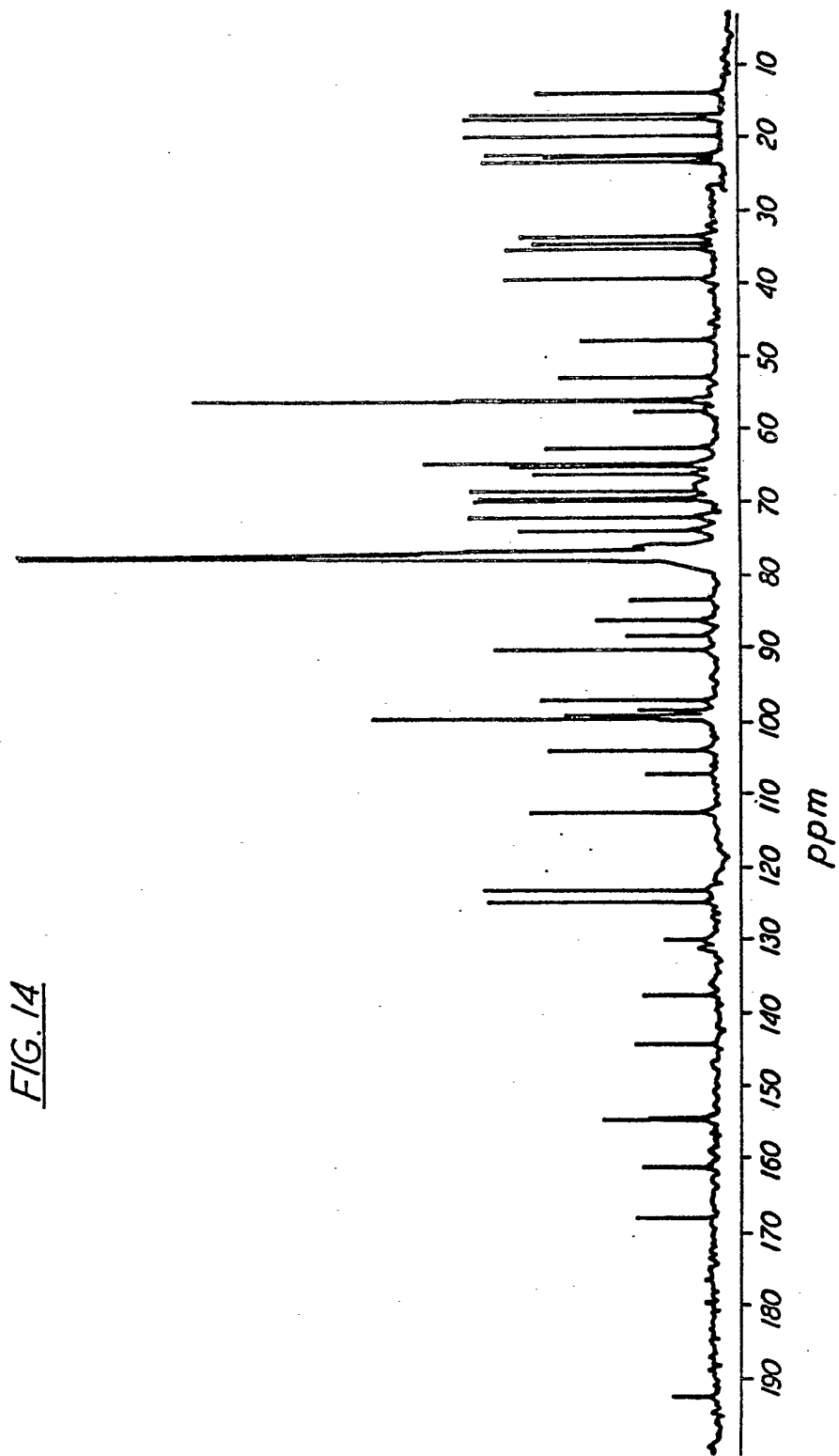


FIG. 14