

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 81 05550

⑤4 Lactones physiologiquement actives présentant des propriétés immunopotentialisatrices et anti-inflammatoires, leur procédé de production et les compositions pharmaceutiques les renfermant.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 D 305/12; A 61 K 31/365; C 12 P 17/02;
C 12 R 1/465.

②2 Date de dépôt..... 13 mars 1981.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : Japon, 14 février 1980, n° 31514/80.

④1 Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 38 du 18-9-1981.

⑦1 Déposant : Société de droit japonais dite : ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU
KAI, résidant au Japon.

⑦2 Invention de : Hamao Umezawa, Takaaki Aoyagi, Tomio Takeuchi, Masa Hamada, Shinichi
Kondo et Masaaki Ishizuka.

⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1

⑦4 Mandataire : Cabinet Germain et Maureau,
Le Britannia, tour C, 20, bd E.-Déruelle, 69003 Lyon.

La présente invention concerne de nouveaux composés physiologiquement actifs présentant des propriétés immunopotentialisatrices et anti-inflammatoires, dénommés Ebelactone A et Ebelactone B, ainsi que leur procédé de production et leur utilisation comme stimulateurs de défense immunitaires et comme agents anti-inflammatoires chez les animaux et l'homme.

De nombreuses souches du genre Streptomyces produisent des substances thérapeutiquement utiles, telles que les antibiotiques. On connaît des substances utiles comme stimulateurs de défense immunitaire ou immunopotentialisateur ou comme agents anti-inflammatoires, mais il existe toujours un besoin d'agents plus efficaces utiles pour le traitement thérapeutique de différentes maladies chez les animaux vivants, y compris chez l'homme.

La demanderesse a effectué des recherches intensives afin de produire et d'obtenir de nouveaux composés physiologiquement actifs. Elle a découvert que, quand on isole une nouvelle souche du genre Streptomyces d'un échantillon de sol venant du terrain de l'Université de Rissho, Kumagaya City, Préfecture de Saitama, Japon, cette souche étant dénommée, au laboratoire, Streptomyces MG7-G1, et qu'on la cultive dans un milieu de culture en conditions aérobiques, on produit et on accumule dans la culture de nouvelles substances qui présentent une activité inhibitrice vis-à-vis de l'estérase et de l'aminopeptidase formylméthionine. Elle a réussi à isoler ces substances du milieu de culture et à les purifier. Les études chimiques, physiques et biologiques de ces substances isolées ont confirmé que chacune d'entre elles constituait un nouveau composé de faible toxicité, distinguable des autres composés connus. Ces composés ont été dénommés respectivement Ebelactone A et Ebelactone B ; ils ont les structures chimiques et les propriétés décrites ci-après.

L'invention concerne donc tout d'abord les nouveaux composés Ebelactone, choisis parmi l'Ebelactone A et l'Ebelactone B qui présentent la formule générale :

L'ébélactone B est également un composé neutre, incolore et cristallin avec un point de fusion de 77°C et une rotation optique spécifique $[\alpha]_D^{26} - 203^\circ$ (c = 1, méthanol). Le poids moléculaire est de 352, déterminé par spectrométrie de masse, et l'analyse élémentaire donne C 71,72, H 10,31, O 18,37 % ce qui coïncide avec les valeurs théoriques de la formule $C_{21}H_{36}O_4$. Le spectre d'absorption ultraviolet de l'ébélactone B fait apparaître un pic d'absorption $\lambda_{\text{MeOH}}^{291 \text{ nm}} (\xi 479)$. Le spectre d'absorption infrarouge de l'ébélactone B pastillé dans du bromure de potassium fait apparaître des pics d'absorption caractéristiques à 3500, 2960, 1825, 1700, 1465, 1390, 1125, 1000, 970 et 870 cm^{-1} . Le spectre d'absorption en résonance magnétique nucléaire proton (δ ppm) de l'ébélactone B dans le deutéro-chloroforme fait apparaître des pics à 1,06 (CH_3 de C-2'), $\sim 1,86$ (CH_2 de C-1'), 3,20 (CH de C-2), 3,92 (CH de C-3), 0,86 (4-CH_3), ~ 2 (CH de C-4), $\sim 1,86$ et 2,38 (CH_2 de C-5), 1,73 (6-CH_3), 5,04 (CH de C-7), 1,12 (8-CH_3), 3,58 (CH de C-8), 1,10 (10-CH_3), 2,86 (CH de C-10), 3,51 (CH de C-11), 3,04 (11-OH), 0,78 (12-CH_3), $\sim 1,43$ (CH de C-12), $\sim 1,73$ (CH_2 de C-13) et 0,87 (CH_3 de C-14).

L'invention a également pour objet un procédé de production d'ébélactone qui consiste à cultiver une souche productrice d'ébélactone du genre Streptomyces en conditions aérobies dans un milieu de culture contenant des sources de carbone et d'azote assimilables pendant un temps suffisant pour produire et accumuler l'ébélactone dans le milieu de culture. Ce procédé peut de plus comporter une étape de récupération de l'ébélactone obtenu.

Avantageusement, le procédé de production de l'ébélactone A consiste à cultiver une souche productrice d'ébélactone A du genre Streptomyces en conditions aérobies dans un milieu de culture contenant des sources de carbone et d'azote assimilables pendant un temps suffisant pour produire et accumuler l'ébélactone A dans le milieu de culture. Le procédé de production de l'ébélactone B consiste

à cultiver une souche productrice d'ébélactone B du genre Streptomyces en conditions aérobies dans un milieu de culture contenant des sources de carbone et d'azote assimilables pendant un temps suffisant pour produire et accumuler l'ébélactone B dans le milieu de culture.

Le procédé comporte en outre une étape de récupération de l'ébélactone A et de l'ébélactone B, soit séparément soit sous forme d'un mélange, sous forme brute ou purifiée.

Comme exemple de souche productrice d'ébélactone on peut mentionner une souche du genre Streptomyces qui a été isolée par les inventeurs à partir d'un échantillon de sol prélevé sur le terrain de l'Université de Rissho, Kumagaya City, Préfecture de Saitama, Japon, et qui est dénommée souche Streptomyces MG7-G1.

Cette souche MG7-G1 a les propriétés microbiologiques suivantes :

1 - Morphologie microscopique

La souche MG7-G1 produit des myceliums de substrats ramifiés. Des hyphes aériens relativement longs et rectiflexibles se développent à partir du mycélium de substrat. On n'observe pas de branchement en spirales ou verticille. Les hyphes aériens murs portent une chaîne de 10 spores ou plus. Les dimensions des spores vont de 0,6 à 0,8 micron de large sur 0,8 à 1,2 micron de long. Au microscope électronique, la surface des spores est lisse.

2 - Caractéristiques de culture sur différents milieux.

Sauf autrement mentionné, les standards de couleur indiqués entre parenthèses ci-après sont basés sur les standards du Color Harmony Manual de la Container Corporation of America.

(1) Sur milieu agar sucrose-nitrate (incubé à 27°C) : croissance incolore à jaune pâle (2 ec, biscuit) à brun jaunâtre pâle (2 gc, bambou) avec hyphes aériens de couleur blanc-brunâtre (3 ec, beige clair) à gris brunâtre (3 ig, brun beige). Pas de pigment diffusable.

(2) Sur milieu agar glucose-asparagine (incubé à 27°C) : croissance incolore à jaune pâle et brun jaunâtre (2 nl,

brun voilé) avec hyphes aériens de couleur blanc brunâtre à gris brunâtre brillant (3 ml, gris castor) et gris brillant (2 fe, gris voilé). Après une incubation d'environ 14 jours, il se produit un pigment diffusable faiblement teinté de

5 brun.

(3) Sur milieu agar glycérine-asparagine (milieu ISP-5 incubé à 27°C) : croissance jaune pâle à brun jaunâtre pâle (2 ie tan moutarde clair) à brun jaune grisâtre (2 li, brun voilé) et brun foncé (3 nl, brun foncé) sur
10 laquelle se forment des hyphes aériens de couleur blanc-grisâtre (2 dc, naturel) à gris brillant (2 fe, gris voilé) et gris brun (3 ig, brun beige). Après environ 10 jours d'incubation, il se produit un pigment diffusable légèrement teinté de brun.

15 (4) Sur milieu agar amidon-sel minéral (milieu ISP-4 incubé à 27°C) : croissance jaune pâle à brun jaunâtre pâle (2 ie, tan moutarde clair) à brun jaune (3 li, castor) sur laquelle se forment des hyphes aériens de couleur blanc brunâtre à gris brillant (2 fe, gris voilé) à gris brunâtre (3 ih, gris beige). Après environ 10 jours d'incubation, il se produit un pigment diffusable légèrement teinté en brun.

(5) Sur milieu agar tyrosine (milieu ISP-7, incubé à 27°C) : croissance brun jaunâtre pâle à brun jaunâtre
25 (2 ni, brun moutarde) sur laquelle se forment des hyphes aériens de couleur gris jaunâtre à gris brillant (2 fe, gris voilé). Après environ 5 jours d'incubation, il se produit un pigment diffusable teinté de brun.

(6) Sur milieu agar nutritif (incubé à 27°C) :
30 croissance brun jaunâtre pâle à brun brillant (3 lg, brun clair) sans formation ou avec peu de formation d'hyphes aériens teintés de brun. Il se produit un pigment diffusable brun.

(7) Sur milieu agar extrait de malt extrait de levure (milieu ISP-2, incubé à 27°C) : croissance brun jaunâtre
35 pâle à brun jaunâtre teinté de gris (2 nl, brun voilé) sur laquelle se forment des hyphes aériens de couleur blanc grisâtre à gris brillant (2 fe, gris voilé) et gris brun.

nâtre (2 ih, gris voilé sombre).

(8) Sur milieu agar farine d'avoine (milieu ISP-3, incubé à 27°C) : croissance brun jaunâtre pâle (2 ie, tan moutarde clair) avec hyphes aériens couleur gris teinté
5 de jaune à gris brillant (2 fe, gris voilé) et gris brunâtre (2 ih, gris voilé foncé). Après environ 21 jours d'incubation, il se produit un pigment diffusable légèrement teinté de brun.

(9) Sur milieu agar glycérine-nitrate (incubé à 27°C) :
10 croissance jaune pâle à brun jaunâtre pâle et brun jaunâtre (3 li, castor) avec hyphes aériens de couleur blanc grisâtre à gris brillant (2 li, brun voilé et gris (3 ih, gris beige).

(10) Sur milieu agar amidon (incubé à 27°C) : crois-
15 sance incolore à jaune pâle et brun jaunâtre (2 lg, tan moutarde) sur laquelle se forment des hyphes aériens de couleur blanc grisâtre à gris brillant (3 fe, gris argent) et gris brunâtre (3 ih, gris beige). Après environ 10 jours d'incubation il se produit un pigment diffusable
20 légèrement teinté de brun.

(11) Sur milieu agar malate de calcium (incubé à 27°C) : croissance jaune pâle avec hyphes aériens de couleur blanc grisâtre à gris brunâtre (3 ig, brun beige). On n'observe pas de pigment diffusable.

25 (12) Sur milieu cellulose (incubé à 27°C) : croissance incolore. On n'observe ni hyphes aériens, ni pigment diffusable.

(13) Sur milieu gélatine en bâtonnets :
Sur milieu gélatine pure (incubé à 20°C) : croissance
30 jaune pâle à brun jaunâtre pâle avec formation légère d'hyphes aériens de teinte blanc brunâtre, et production de pigment brun diffusable. Sur milieu gélatine-peptone-glucose (incubé à 27°C) croissance brun jaunâtre pâle sans hyphes aériens. Production de pigment diffusable
35 faiblement teinté de brun.

(14) Sur milieu lait écrémé (incubé à 37°C) : croissance jaune pâle à brun pâle et brun jaunâtre sans hyphes

aériens. Production de pigment diffusable légèrement teinté de brun.

3 - Propriétés physiologiques

5 (1) Température de croissance : croît à 20°C, 24°C, 27°C, 30°C et 37°C mais non à 50°C quand l'essai est fait à ces températures sur milieu agar asparagine glucose. Il apparaît que la température optimum de croissance se situe entre 24°C et 30°C.

10 (2) Liquéfaction de la gélatine. Quand l'incubation est effectuée à 20°C sur milieu à 15 % de gélatine pure et à 27°C sur milieu gélatine-peptone-glucose, la liquéfaction s'amorce au bout d'environ 6 jours d'incubation, dans les deux cas à un degré moyen.

15 (3) Hydrolyse de l'amidon. Quand l'incubation est effectuée à 27°C sur milieu agar sel minéral-amidon et à la même température sur milieu agar-amidon, l'hydrolyse de l'amidon commence effectivement, moyennement ou fortement, au bout d'environ 6 jours d'incubation.

20 (4) Coagulation et peptonisation du lait écrémé (incubé à 37°C). La coagulation s'amorce au bout d'environ 5 jours d'incubation et est terminée au bout de 7 jours d'incubation, et immédiatement suivie de peptonisation. La peptonisation est terminée au bout de 14 jours d'incubation. Le taux de peptonisation est moyen à fort.

25 (5) Formation de pigment mélanoïde (incubation à 27°C sur bouillon extrait de levure-trypton, milieu ISP-1, incubation à 27°C sur agar fer-extrait de levure-peptone, milieu ISP-6 ; et incubation à 27°C sur agar tyrosine, milieu ISP-7) :

30 On observe une formation de pigment mélanoïde sur milieu bouillon extrait de levure-trypton et sur milieu tyrosine-agar. La souche MG7-G1 ne croît pas sur le milieu agar fer -extrait de levure - peptone, mais elle croît et produit du pigment mélanoïde sur le milieu obtenu en éliminant le composant citrate d'ammonium fer du milieu agar
35 fer - extrait de levure-peptone.

(6) Utilisation de sources de carbone pour la crois-

sance (estimée sur milieu Pridham-Gottlieb, milieu ISP-9 avec incubation à 27°C).

Le glucose est utilisé pour la croissance. Les L-arabinose, D-xylose, D-fructose, sucrose, inositol, L-rhamnose, raffinose et D-mannitol ne sont pas utilisés.

(7) Dissolution du malate de calcium (incubation à 27°C sur milieu agar malate de calcium).

Au bout d'environ 6 jours d'incubation, le malate de calcium commence à se dissoudre autour de la croissance et le degré de dissolution est moyen à fort.

(8) Réduction du nitrate (estimé dans une solution aqueuse de peptone contenant 1 % de nitrate de potassium, milieu ISP-8, incubation à 27°C) : négative.

Pour résumer ce qui précède, on peut dire que la souche MG7-G1 appartient au genre Streptomyces et est caractérisée par l'absence de verticilles ou spirales sur les hyphes aériens, ainsi que par la surface lisse des spores.

Il faut de plus noter que, sur différents milieux de culture, la souche MG7-G1 donne une croissance colorée en jaune pâle à brun jaunâtre pâle et brun jaunâtre avec des hyphes aériens de couleur blanc grisâtre à gris brillant et gris brunâtre et produit un pigment diffusable légèrement teinté en brun et que cette souche présente une chromogénicité positive, un degré moyen de protéolyse et un degré moyen à fort d'hydrolyse de l'amidon.

Sur la base des propriétés mentionnées ci-avant on a comparé la souche MG7-G1 à d'autres espèces connues de Streptomyces, en se référant aux descriptions faites dans les ouvrages suivants : H. Nishimura et al "Journal of Antibiotics" Ser. A, Vol. 10, page 205 (1957) ; Manuel de Bergy "Determinative Bacteriology", 8ème Edition, page 761 ; "International Journal of Systematic Bacteriology" Vol. 18, N° 4, page 284 (1968) ; et Actinomycetes, Vol 2, page 166. Les caractéristiques de la souche MG7-G1 sont très proches de celles de Streptomyces aburaviensis.

On a obtenu un échantillon de culture de Streptomyces aburaviensis et on l'a comparé à la souche MG7-G1. Les

résultats de la comparaison sont rassemblés dans la
Table I.

TABLE 1

	Propriétés	MG7-G1	Streptomyces aburaviensis ISP 5033
5	Forme des hyphes aériens	Rectiflexibles	Rectiflexibles
	Surface des pores	Lisse	Lisse
	Couleur des hyphes aériens	Blanc grisâtre à gris brillant et gris brunâtre	Blanc grisâtre à gris et gris brunâtre
10	Couleur de la croissance	Jaune pâle à brun jaunâtre pâle et brun jaunâtre	Jaune pâle à brun jaunâtre pâle et jaune foncé
	Pigment diffusable	Négatif ou teinté de brun	Négatif ou tein- té de brun
15	Chromogénicité :		
	sur milieu ISP-1	+	-
	sur milieu ISP-6	Pas de croissance	-
	sur milieu ISP-7	(+)	-
	Hydrolyse de l'ami- don	+	+
20	Coagulation du lait	+	+
	Peptonisation du lait	+	+
	Liquéfaction de la gé- latine :		
	sur gélatine pure	+	+
25	sur gélatine-glucose- peptone	+	-
	Réduction du nitrate	±	-
	Utilisation de sour- ces de carbone :		
	Glucose	+	+
30	L-arabinose	±	-
	D-xylose	-	- *
	D-fructose	-	- *
	Sucrose	-	-
	Inositol	-	-
	L-rhamnose	-	-
	D-mannitol	-	-

35

Nota : (+) signifie probablement + ; ⁺ signifie légèrement
+ ; ⁻ signifie probablement -.
* signifie + dans la description de l'International Journal
of Systematic Bacteriology

Comme il ressort de la Table I, la souche MG7-G1 présente, avec la souche Streptomyces aburaviensis ISP 5033 les différences suivantes : 1) la première présente une chromogénicité positive alors que la seconde présente une chromogénicité négative sur milieu ISP 1 et 7 ; 2) la première ne croît pas sur milieu ISP-6 tel que, mais croît sur ce milieu, avec formation de pigment mélanoïde, quand on en a retiré le composant citrate d'ammonium fer, alors que la seconde croît sur milieu ISP-6 sans formation de pigment mélanoïde.

La souche MG 7-G1 présente, avec la souche Streptomyces aburaviensis les différences mentionnées ci-dessus mais les deux souches présentent les mêmes propriétés en de nombreux autres points, ce qui montre qu'il s'agit d'espèces très voisines. La souche Streptomyces MG7-G1 a été déposée auprès de l'Organisme officiel japonais "Fermentation Research Institute" Agency of Industrial Science and Technology, Tukuba-gun, Préfecture d'Ibaragi, Japon, sous le numéro de dépôt FERM-P 5663 le 18 janvier 1980, ainsi qu'à l'American Type Culture Collection, Washington DC, USA sous le n° ATCC 31820.

Il se produit fréquemment des mutations d'actinomycètes que ce soit en conditions artificielles ou spontanées. L'invention concerne donc l'utilisation de la souche MG7-G1 aussi bien que de ses variants et mutants pour autant qu'ils produisent l'ébé lactone.

L'ébé lactone peut être produite par culture aérobie de spores ou mycelia d'une souche productrice d'ébé lactone du genre Streptomyces, par exemple la souche Streptomyces MG7-G1 (identifiée sous les références FERM-P 5363 ou ATCC N° 31820).

Dans le procédé selon l'invention on inocule une certaine quantité de spores ou mycelia d'une souche productrice d'ébé lactone à un milieu de culture convenable contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, puis on incube en conditions aérobies, de préférence en conditions aérobies submergées de sorte que l'ébé lactone

soit produite et accumulée dans le bouillon de culture. On peut de façon générale utiliser comme milieu de culture les constituants nutritifs habituellement employés pour la culture des actinomycètes ordinaires.

5 On peut citer comme sources de carbone utiles, des produits disponibles dans le commerce tels que la glycérine, le glucose, le lactose, le sucrose, l'amidon, le maltose, les mélasses et autres hydrates de carbone, les graisses et huiles, ainsi que les sels d'acides aliphatiques inférieurs tels que l'acide malonique, l'acide maléique et similaires. Comme sources d'azote on peut utiliser des produits disponibles dans le commerce tels que la peptone, l'extrait de viande, la farine de graines de coton (par exemple Pharma -Media), la farine d'arachides, la farine de soja, l'extrait de levure, l'amine N-Z, la caséine, la L-asparagine, la farine de poisson, le nitrate de sodium ou d'ammonium, le sulfate d'ammonium et similaires. On peut de plus ajouter au milieu de culture du chlorure de sodium, des phosphates, du carbonate de calcium, du sulfate de magnésium et d'autres sels minéraux.

15 On peut également ajouter, en traces, d'autres sels métalliques et différents sels de métaux lourds, pour autant qu'ils soient utilisés par la souche productrice d'ébélactone et n'exercent pas d'effet néfaste sur la production de celle-ci. Tous les éléments nutritifs connus pour la culture des actinomycètes peuvent être employés dans le procédé selon l'invention, pour autant qu'ils soient assimilables par la souche productrice d'ébélactone pour la production de cette dernière.

25 Comme source de carbone on préfère la glycérine et comme source d'azote la farine de poisson. On préfère comme milieu de culture, un milieu contenant 3 % de glycérine, 2 % de farine de poisson et 0,2 % de carbonate de calcium.

30 Pour la production à grande échelle d'ébélactone, on préfère la culture liquide. On peut effectuer la culture à toute température à laquelle la souche productrice d'ébélactone est susceptible de croître et de produire l'ébé-

lactone mais le domaine de température préférée pour l'incubation se situe entre 20 et 37°C et spécialement à 27°C. On poursuit la culture pendant une durée suffisante pour produire et accumuler dans le milieu ou le bouillon 5 de culture une quantité suffisante d'ébélactone. Par exemple, cette production et cette accumulation atteint son maximum à la fin de l'incubation au bout de 1 à 3 jours, si l'on a préparé et stérilisé un milieu de culture contenant 3 % de glycérine, 2 % de farine de poisson, 0,2 % 10 de carbonate de calcium, que l'on a inoculé avec des spores et mycelia récoltées d'une culture en pente de la souche MG7-G1 et que l'on a cultivé sous agitation en conditions aérobies à 27°C.

La détection de l'ébélactone obtenu au cours de 15 la culture du microorganisme producteur, aussi bien que la récupération et la purification de l'ébélactone peut être effectuée par détermination de l'activité anti-estérase et de l'activité anti-formylméthionine aminopeptidase selon les méthodes suivantes.

20 En premier lieu, le test de l'activité anti-estérase de l'ébélactone peut être effectué en déterminant le pouvoir d'inhibition de l'estérase selon une modification de la méthode de C. Huggins et J. Lapidès "J. Biol. Chem.", 170, 467 (1947). On dilue à 1000 fois son volume avec de 25 l'eau une préparation d'estérase à partir de foie de porc disponible dans le commerce (vendue par SIGMA C°, USA) ; on mélange la solution d'estérase résultante (0,025 ml) avec 1 ml d'une solution tamponnée de phosphate 0,1 M (pH 7,0) contenant 0,06 % de Triton X-100 (marque déposée pour un 30 émulsifiant à base d'alkylphényléther de polyéthylèneglycol, vendu par Rohm & Haas C°, U.S.A.) et 0,95 ml d'eau contenant un échantillon de l'ébélactone à essayer ; on mélange la solution obtenue (1,975 ml) avec 0,025 ml d'une solution de 40 mM d'acétate de p-nitrophényl (le substrat) 35 dans du méthanol pour amorcer la réaction de l'acétate de p-nitrophényl avec l'estérase. Une fois la réaction enzymatique effectuée à température ambiante pendant 20 minutes,

14

on mesure l'absorbance (a) à 400 nm de la solution réactionnelle. On mesure d'autre part de la même façon l'absorbance (b) à 400 nm d'une solution de contrôle ne contenant pas d'ébé lactone. On calcule le pourcentage d'inhibition de l'estérase selon l'équation :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(b - a)}{b} \times 100$$

Selon cette méthode d'essai, le produit cristallin incolore d'ébé lactone A (produit de l'exemple 8 ci-après) a un pouvoir inhibiteur tel que son ID₅₀, c'est-à-dire la dose pour donner 50 % d'inhibition à l'estérase, est de 0,056 mcg/ml et le produit cristallin incolore d'ébé lactone B (produit de l'exemple 9 ci-après) a un pouvoir inhibiteur tel que son ID₅₀ est de 0,00035 mcg/ml.

Le test de l'activité anti-formylméthionineaminopeptidase de l'ébé lactone peut être effectué selon la méthode suivante : On utilise, comme solution substrat, une solution de N-formylméthionine β-naphtylamide dans du méthanol contenant 5 % (poids/volume) de Tween 20 (tensioactif non ionique commercialisé par Atlas Powder CO, U.S.A.). La formylméthionineaminopeptidase employée est celle préparée à partir de foie de rat. On mélange à un volume total de 0,95 ml la solution-substrat (0,005 ml), 0,5 ml de solution tamponnée 0,1 M d'acide tris-chlorhydrique (pH 7,8) et 0,495 ml d'eau contenant un échantillon de l'ébé lactone à essayer. On mélange ensuite la solution réactionnelle ainsi obtenue avec 0,05 ml de la solution d'enzyme puis on effectue la réaction enzymatique pendant 25 minutes à 37°C. La solution réactionnelle est ensuite mélangée à 1 ml d'une solution contenant du Fast Garnet GPC (produit vendu par SIGMA C°, USA) à une concentration de 1 mg/ml dans une solution tamponnée d'acétate 1 M (pH 4,2) contenant 10 % de "Tween" 20 pour stopper la réaction enzymatique. Après maintien à température ambiante pendant 15 minutes, on mesure l'absorbance (a) à 525 nm de la solution réactionnelle. On mesure d'autre part l'absorbance (b) à 525 nm d'une solution témoin. On calcule le pourcentage d'inhibition de la

formylméthionineaminopeptidase de façon similaire à celle mentionnée ci-avant pour l'estérase. Selon cette méthode, le produit cristallin incolore d'ébé lactone A a un pouvoir inhibiteur tel que son ID₅₀, c'est-à-dire la dose pour donner 50 % d'inhibition à la formylméthionineamino-peptidase est de 0,08 mcg/ml, et le produit cristallin incolore d'ébé lactone B a un pouvoir inhibiteur tel que son ID₅₀ est de 0,02 mcg/ml.

L'ébé lactone peut être produit aussi bien par une méthode de culture en cuve que par une méthode de culture sous agitation. Par exemple, on place 1000 l d'un milieu de culture liquide contenant 3 % de glycérine, 2 % de farine de poisson et 0,2 % de carbonate de calcium dans une cuve de fermentation de 2 000 l, on stérilise et on inocule le milieu avec une culture en pente de la souche MG7-G1 à une dimension d'inoculum de 2 %, en faisant passer au travers du milieu de culture de l'air stérile à une vitesse de 800 l/minute, en agitant avec un agitateur rotatif à 240 t.p.m. La température d'incubation est de 27°C. Dans cette expérience, la production d'ébé lactone atteint un maximum à la fin de 37 heures d'incubation. L'ébé lactone produite est présente dans le bouillon de culture ainsi que dans les mycelia de la souche MG7-G1. Pour récupérer l'ébé lactone on peut extraire le bouillon de fermentation une fois la réaction terminée, avec un volume égal d'un solvant organique non miscible à l'eau tel que l'acétate de butyl, le butanol et similaires en mélangeant le bouillon de fermentation au solvant organique et en agitant le mélange pendant plusieurs heures pour transférer l'ébé lactone de la phase liquide de la culture et des mycelia à la phase solvant organique. L'ébé lactone présent dans le filtrat du bouillon de fermentation peut aussi être extrait par un solvant organique non miscible à l'eau tel que le butanol, l'acétate de butyl et similaires et l'ébé lactone présent dans les mycelia peut être extrait par un solvant organique miscible à l'eau tel que le méthanol, l'éthanol ou similaire. On peut aussi

5 récupérer l'ébélactone avec un bon rendement à partir d'une
solution la contenant par adsorption sur un adsorbant a-
dapté suivie de désorption. On peut employer dans ce but
un adsorbant minéral tel que le charbon actif, l'alumine,
10 le gel de silice et le silicate de magnésium (Frorigil)
ainsi qu'un adsorbant organique tel que l'Amberlite XAD
(résine non-ionique, hautement micro-poreuse, produit par
Rohm & Haas, C°, USA). On peut par exemple adsorber l'é-
bélactone sur du gel de silice et l'en éluer avec un mé-
lange n-hexane-chloroforme.

15 Pour isoler l'ébélactone A de l'ébélactone B, il
est spécialement efficace de soumettre un mélange de ces
deux produits à une chromatographie sur colonne avec un
gel de silice de chromatographie en phase inverse préparé
par liaison d'un silane aux surfaces du gel de silice,
l'élution étant faite avec un mélange méthanol-eau. On
peut par exemple récupérer et isoler les ébélactones A
et B par extraction du filtrat du bouillon de fermentation
20 avec un solvant organique non miscible à l'eau tel que
l'acétate de butyl, concentration de l'extrait acétate
de butyl sous pression réduite pour obtenir un concen-
trat huileux, purification de cette huile par chromato-
graphie sur gel de silice, puis passage à nouveau en chro-
matographie sur colonne de gel de silice développée avec
25 un système de solvant adapté tel que n-hexane-chloroforme
ce qui permet d'obtenir d'une part les fractions actives
de l'éluat contenant l'ébélactone A seul et d'autre part
les fractions actives contenant l'ébélactone B seul ; on
isole ensuite séparément les ébélactones A et B des
30 fractions actives respectives.

On peut effectuer la purification finale de l'ébé-
lactone par cristallisation. Comme chacun des ébélactones
A et B est bien cristallisable, il se dépose sous forme
d'aiguilles à partir d'une solution dans un mélange mé-
35 thanol-eau.

L'étude des propriétés pharmacologiques de l'ébé-
lactone a permis de trouver qu'il présente une activité

pour la stimulation de la réponse immunologique chez un animal vivant en augmentant l'immunité cellulaire aussi bien que pour la réduction des inflammations chez un animal vivant. Les propriétés pharmacologiques de l'ébé lactone sont
5 décrites ci-après.

(1) Influence de l'ébé lactone sur l'augmentation de l'immunité cellulaire.

Cette influence a été étudiée selon une technique connue d'hypersensibilité type retardé (DTH) (Cf. P.H. Lagrange, G.B. Mackaness et T.E. Mille : "J. Exp. Med.",
10 159, 1529-1539 (1974) en utilisant des souris immunisées avec des plaques sanguines de mouton (SRBC) comme anti-gène.

On inocule donc 10^8 SRBC mises en suspension dans
15 0,05 ml de solution saline physiologique par injection sous-cutanée sur l'un des côtés de la semelle plantaire arrière de souris CDF₁ (5 souris par groupe, femelle, 8 semaines) pour les immuniser. Simultanément à cette immunisation on injecte à chaque souris, par voie intra-péritonéale, 50 mg/kg, 12,5 mg/kg, 3,125 mg/kg ou 0,78
20 mg/kg d'ébé lactone. Quatre jours plus tard on injecte par voie sous-cutanée dans l'autre côté de la semelle plantaire arrière de chaque souris 10^8 SRBC pour en déduire la réponse immunitaire. 24 heures après cette in-
25 jection on mesure l'épaisseur (en mm) de la semelle plantaire pour évaluer le degré de gonflement dans la patte qui a reçu cette injection. Le taux de gonflement sert de mesure de l'immunité cellulaire. Les résultats de l'essai sont rassemblés dans la Table 2 ci-après.

TABLE 2

Influence de l'ébé lactone sur l'établissement de la réponse DTH à SRBC chez les souris

Composé examiné	Injection d'antigène pour immunisation (0 jour)	Dose d'ébé lactone (mg/kg)	Injection d'éllicitation (4ème jour après immunisation)	Épaisseur plante de patte (x 0,1 mm)
Ebé lactone B	10 ⁸ SRBC	Intrapéritonéale 0 (contrôle)	10 ⁸ SRBC	7,4
	"	50	"	12,2
	"	12,5	"	13,3
	"	3,125	"	13,6
"	0,781	"	"	14,2

Ebé lactone B	10 ⁸ SRBC	Orale 0 (contrôle)	10 ⁸ SRBC	8,1
	"	0,5	"	14,1

Ebé lactone A	10 ⁸ SRBC	0,5	10 ⁸ SRBC	12,2

Il ressort de ces résultats que l'administration d'ébé lactone à une dose de 0,781-50 mg/kg par injection intrapéritonéale ou à une dose de 0,5 mg/kg par voie bucale à des souris, augmente de façon remarquable la réponse DTH et que l'ébé lactone présente un effet potentialisateur sur l'immunité cellulaire.

(2) Influence de l'ébé lactone sur la réduction de l'inflammation.

On fait des essais pour estimer l'effet suppressif de l'ébé lactone et de l'estérastine (USP 4 189 438 et 4 242 453) sur le gonflement de la semelle plantaire occasionné par injection de carragheénine quand les composés à examiner sont administrés par voie orale ou intrapéritonéale à l'animal d'essai (rats Wister, mâles, poids : 140 à 150 g). Le composé à essayer est dissous dans environ 0,5 ml d'éthanol additionné d'une goutte de l'agent tensio-actif non-ionique "Tween 80", et cette solution dans l'éthanol est diluée avec une solution aqueuse de gomme arabique pour préparer une suspension aqueuse contenant la dose à essayer d'ébé lactone ou d'estérastine. La suspension ainsi préparée est alors administrée, par voie orale ou intrapéritonéale, aux rats. Une heure plus tard on fait une injection sous-cutanée dans la semelle plantaire de 1 % de carragheénine aqueuse. Après cette injection, on mesure le volume de la semelle plantaire d'abord au bout de trois heures puis au bout de cinq heures. Pour l'essai de contrôle, on omet l'ébé lactone ou l'estérastine. Le degré (%) de suppression de gonflement est calculé à partir des volumes mesurés de la semelle plantaire inflammée. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tables 3 et 4.

20

TABLE 3

Effet suppressif sur l'inflammation de
l'ébé lactone et de l'estérastine administrés oralement

5	Composé essayé	Degré (%) de suppression du gon- flement	
		3 heures	5 heures
	Gomme arabique (contrôle)	-	-
10	Estérastine (50 mg/kg) (à titre comparatif)	10,3 %	- 3,0 %

	Ebé lactone B (10 mg/kg)	11,2 %	8,2 %
	Ebé lactone B (50 mg/kg)	11,6 %	7,8 %
15	Ebé lactone B (100 mg/kg)	7,0 %	9,6 %

TABLE 4

Effet suppressif sur l'inflammation de
l'ébé lactone et de l'estérastine administrés par
voie intrapéritonéale

25	Composé essayé	Degré (%) de suppression du gon- flement	
		3 heures	5 heures
	Gomme arabique (contrôle)	-	-
30	Estérastine (30 mg/kg) (à titre comparatif)	31,1 %	28,1 %

	Ebé lactone B (5 mg/kg)	17,1 %	8,8 %
	Ebé lactone B (10 mg/kg)	9,1 %	10,0 %
	Ebé lactone B (30 mg/kg)	50,6 %	20,9 %
35	Ebé lactone A (30 mg/kg)	45,9 %	18,5 %

Il ressort de ces tables que , par administration orale d'ébélactone B, on peut obtenir avec 10 mg/kg d'ébélactone B une réduction significative du degré de gonflement comparativement au groupe contrôle aussi bien 3 heures que 5 heures après injection de carraghénine ; avec une dose de 50 mg/kg d'ébélactone B, 3 heures après injection de carraghénine et avec une dose de 100 mg/kg d'ébélactone B, 5 heures après injection de carraghénine. On peut de plus noter que, par administration intrapéritonéale d'ébélactone, on constate une réduction significative du degré de gonflement par rapport au contrôle, avec toutes les doses d'ébélactone A et B ainsi que pour toutes les durées, sauf au bout de 5 heures avec une dose de 5 mg/kg et au bout de 3 heures avec une dose de 10 mg/kg d'ébélactone B. On peut observer des résultats similaires avec l'ébélactone A.

D'autres tests ont permis de constater que l'ébélactone à une concentration de 100 mcg/ml ne présente pas de toxicité cellulaire vis-à-vis des cellules tissulaires et qu'une dose de 250 mg/kg d'ébélactone (par voie intrapéritonéale) ne laisse apparaître aucun symptôme de toxicité dans tous les tests d'estimation de toxicité aigüe chez les souris.

Ceci, ainsi que les résultats mentionnés ci-avant, montre que l'ébélactone est de faible toxicité et est utile comme agent pharmaceutique qui peut être employé avec une grande sécurité et qu'il est utile au moins en tant qu'agent potentialisateur de l'immunité cellulaire.

L'invention concerne donc également une composition pharmaceutique contenant une quantité sûre et efficace d'au moins un des ébélactones A et B, en mélange avec un support pharmaceutiquement acceptable.

L'invention concerne plus particulièrement un stimulateur de défense de l'hôte, permettant d'augmenter la réponse immunitaire chez un animal vivant, qui contient comme ingrédient actif au moins l'un des ébélactones A et B, en combinaison avec un support pharmaceutiquement ac-

ceptable de l'ingrédient actif.

La méthode permettant de stimuler la réponse immunitaire chez un animal vivant consiste à administrer audit animal une quantité sûre et immunopotentiellement efficace d'au moins un des ébé lactones A et B.

L'invention concerne également une composition anti-inflammatoire pour le traitement des inflammations chez un animal vivant, qui contient, comme ingrédient actif, au moins l'un des ébé lactones A et B en combinaison avec un support pharmaceutiquement acceptable dudit ingrédient actif. La méthode de traitement des inflammations chez un animal vivant consiste à administrer audit animal une quantité sûre et efficace d'au moins l'un des ébé lactones A et B.

La composition pharmaceutique selon l'invention, qu'elle soit utilisée comme stimulateur de défense de l'hôte ou comme agent/^{anti-}inflammatoire peut être formulée sous des formes conventionnelles administrables par voie orale, telle que des tablettes, capsules, poudres, solutions et suspensions, soit en mélangeant une certaine quantité d'ébé lactone avec un support solide pharmaceutiquement acceptable, tel que l'amidon, le sucrose, le talc, et le carbonate de calcium, soit en dissolvant ou en mettant en suspension une certaine quantité d'ébé lactone dans un support liquide pharmaceutiquement acceptable tel que l'éthanol et l'eau. Les proportions d'ébé lactone et de support solide ou liquide peuvent être choisies de façon appropriée selon la forme de la formulation administrable oralement, et se situent habituellement entre 1:1 et 1:100 en poids.

La composition selon l'invention peut également être formulée sous forme de solutions injectables ou de suspensions en dissolvant ou en mettant en suspension l'ébé lactone à une dose de 0,1 % à 10 % en poids dans une solution saline physiologique ou tout autre véhicule liquide pharmaceutiquement acceptable tel que la solution de Ringer, avec ou sans aide d'un dispersant convenable. La

solution ou la suspension injectable ainsi préparée peut être administrée par injection intraveineuse, intramusculaire ou intrapéritonéale.

On peut se rendre compte que la dose préférée d'ébé-
5 lactone utilisée variera selon la composition particulière
formulée, le mode d'administration et la maladie à traiter.
L'homme de l'art tiendra compte de nombreux facteurs modi-
fiant l'action du médicament selon l'invention, tels que,
par exemple, l'âge, le poids, le sexe, le régime, la durée
10 et la voie d'administration, le taux d'excrétion, les combi-
naisons de médicaments, les sensibilités réactionnelles et
la sévérité de la maladie. En règle générale, on peut don-
ner entre 0,5 mg/lg à environ 100 mg/kg d'ébé lactone par
jour à un adulte. Les doses optimales, pour une gamme de
15 conditions chez un patient, peuvent être déterminées par
le spécialiste en utilisant les tests classiques de dé-
termination des doses selon les indications ci-dessus, et
selon les expériences passées pour la détermination des do-
ses adaptées des médicaments connus.

20 Les exemples suivants illustreront l'invention sans
pour autant la limiter.

Exemple 1

On inocule une boucle de culture inclinée de souche
Streptomyces MS7-G1 (FERM-P 5363 ou ATCC N° 31820), en
25 tant que souche productrice d'ébé lactone, à 15 litres d'un
milieu de culture contenant 3,0 % de glycérine, 2,0 % de
farine de poisson et 0,2 % de carbonate de calcium, placé
en portions de 110 ml dans des fioles rotatives de 500 cc,
et stérilisé par chauffage pendant 20 minutes à 120°C.

30 L'incubation est menée pendant 10 jours consécutifs
à 27°C à une vitesse de rotation de 180 t.p.m., des échan-
tillons du milieu incubé étant prélevés régulièrement, et
chaque échantillon étant examiné quant au pouvoir de l'é-
bé lactone, afin d'observer la production d'ébé lactone pen-
35 dant la période d'incubation. Cette production atteint un
maximum au 2ème jour d'incubation et le niveau de subs-
tance inhibant l'estérase dans le milieu d'incubation

diminue lentement depuis le 3ème jour d'incubation. Le pH du milieu incubé varie de 7,0 le premier jour à 6,6, le second jour, 7,3 le 3ème jour, 7,8 le 4ème jour et 8,2 le 5ème jour.

5 Exemple 2

On cultive la souche Streptomyces MG7-G1 (FERM-P 5363 ou ATCC N° 31820) pendant 2 jours en utilisant les mêmes milieu de culture et conditions d'incubation que celles de l'exemple 1, et le bouillon de fermentation ainsi obtenu (2,5 l, activité antiestérase, ID₅₀: 1 µg/ml) est mélangé à 2,5 l d'acétate de butyl. Le mélange résultant est agité pendant 3 heures à température ambiante, puis filtré à l'aide d'un adjuvant de filtration (terre de diatomée vendue sous le nom de "Hyflo-Supercel"). Le filtrat obtenu est séparé en phase acétate de butyl et phase aqueuse. La phase acétate de butyl est concentrée sous pression réduite pour donner 4,36 g d'un produit huileux contenant l'ébé lactone.

15 Exemple 3

20 Le produit huileux (4,36 g) obtenu dans l'exemple 2 et contenant l'ébé lactone est chromatographié à travers une colonne (2,5 x 35 cm) d'un gel de silice (Wako Gel C-200, vendu par WAKO CHEMICAL, Japon) en utilisant comme éluant un mélange de n-hexane-chloroforme-acétate d'éthyl (5:5:1 en volume). L'éluat est rassemblé en fractions de 25 10 g ; les fractions n° 41-137 contiennent la substance active, l'ébé lactone. Les fractions actives combinées sont concentrées à siccité sous pression réduite pour donner un produit huileux jaune clair. Rendement 434 mg.

30 Exemple 4

Le produit huileux (434 mg) obtenu dans l'exemple 3 est chromatographié à travers une colonne (1,2 x 47 cm) de gel de silice phase inversée (Silicagel 60, Silanized de Merck C°, R.F.A.) en utilisant comme éluant un mélange 35 méthanol-eau (1:1 en volume). L'éluat est rassemblé en fractions de 10 ml et l'on obtient les fractions actives n° 38-53 contenant l'ébé lactone A et les fractions actives

n° 65-81 contenant l'ébélactone B. Ces fractions actives sont respectivement combinées et concentrées sous pression réduite pour donner 20 mg d'une poudre incolore d'ébélactone A et 10 mg d'une poudre incolore d'ébélactone B. Ces produits donnent une tache unique (Rf 0,72 et 0,80 respectivement) une fois développés en chromatographie en couche mince sur gel de silice avec un mélange n-hexane-chloroforme-acétate d'éthyl (5:5:1 en volume).

Exemple 5

10 Un milieu de culture (1000 l) contenant 3,0 % de glycérine, 2,0 % de farine de poisson, 0,2 % de carbonate de calcium et 0,01 % de produit antimousse (polyoxyalkylène vendu sous le nom "Adecanol", Asahi Denka C°, Japon) est chargé dans un réservoir en acier inoxydable de 2 000 l
15 puis stérilisé par chauffage à 120°C pendant 30 minutes. On inocule à ce milieu de culture stérilisé 50 l d'une culture obtenue par incubation de souche Streptomyces MG7-G1 (FERM-P 5363-ATCC 31820) pendant 2 jours à 28°C sous aération et agitation. Le milieu de culture inoculé est
20 incubé à 28°C pendant 43 heures à une vitesse d'aération de 80 l/minute et à une vitesse d'agitation de 240 t.p.m. Le bouillon de fermentation ainsi obtenu est mélangé à 350 l d'acétate de butyl puis agité pendant 4 heures, décanté et filtré à l'aide d'un adjuvant de filtration
25 (Hyflo-Supercel) et au moyen d'une centrifugeuse à panier pour enlever les mycelia. La phase acétate de butyl est ainsi éliminée puis concentrée sous pression réduite pour donner 1,9 litre d'une solution concentrée contenant l'ébélactone.

30 Exemple 6

La solution concentrée (1,9 l) obtenue dans l'exemple 5 et contenant l'ébélactone est placée dans une colonne (10 x 60 cm) de gel de silice (Wako-Gel C-100, vendu par WAKO CHEMICAL C°, Japon) qui est ensuite lavée par passage
35 de 7 l de n-hexane. La colonne est ensuite développée avec 4,5 l d'un mélange n-hexane-chloroforme (1:1 en volume) puis avec 10 l d'un mélange n-hexane-chloroforme-acétate

d'éthyl (5:5:1 en volume) comme éluant. L'éluat est rassemblé en fractions de 50 ml et l'on obtient les fractions actives n° 81-200. Ces fractions actives sont combinées et concentrées pour donner 150,9 g d'un produit huileux.

5 Exemple 7

Le concentrat huileux (71,6 g) obtenu dans l'exemple 6 et contenant l'ébé lactone est chromatographié dans une colonne (5,5 x 17,5 cm) de gel de silice phase inversée (Silicagel 60, Silanized, Merck C°, R.F.A.) en utilisant
10 comme éluant un mélange méthanol-eau (1:1 en volume). L'éluat est rassemblé en fractions de 20 ml.

En chromatographie en couche mince, l'ébé lactone A est surtout détecté dans les fractions n° 105-147 dans lesquelles on ne peut détecter l'ébé lactone B. Les ébé lactones A et B sont toutes deux détectées dans les fractions
15 n° 148-270 et l'ébé lactone B dans les fractions n° 271-443 dans lesquelles on ne peut détecter l'ébé lactone A. Les fractions combinées n° 105-147, 148-270 et 271-443 sont concentrées sous pression réduite pour donner respectivement
20 392 mg d'une poudre jaune, 974 mg d'une poudre jaune et 518 mg d'une poudre jaune.

Exemple 8

La poudre jaune (392 mg) obtenue dans l'exemple 7 et contenant principalement l'ébé lactone A est chromatographiée sur colonne de gel de silice (Wako-Gel C-300, WAKO
25 CHEMICAL C°, Japon, 1,3 x 48 cm) en utilisant comme éluant un mélange n-hexane-chloroforme (3:1 en volume). L'éluat est rassemblé en fractions de 5 g et les fractions actives n° 101-130 sont combinées et concentrées sous pression réduite pour donner 175 mg d'une poudre incolore d'ébé lactone A qui donne une tache unique (Rf 0,72) en chromatographie en couche mince sur gel de silice en utilisant
30 un mélange n-hexane-chloroforme-acétate d'éthyl (5:5:1 en volume). Cette poudre incolore est dissoute dans un petit volume de méthanol et on ajoute à la solution méthanolique, en petites quantités, de l'eau pour donner
35 128 mg d'aiguilles d'ébé lactone A. Ptf. 86°C. Ce produit

crystallisé à un ID_{50} vis-à-vis de l'estérase de 0,056 mcg/ml.

Exemple 9

5 La poudre jaune (518 mg) obtenue dans l'exemple 7 et contenant essentiellement l'ébé lactone B est chromatographiée sur colonne de gel de silice (Wako-Gel C-300, WAKO CHEMICAL C°, Japon, 1,3 x 50 cm) en utilisant comme éluant un mélange de n-hexane-chloroforme (3:1 en volume).
10 L'éluat est rassemblé en fractions de 10 g et les fractions actives n° 49-58 sont combinées et concentrées sous pression réduite pour donner 219 mg d'une poudre incolore d'ébé lactone B qui donne une tache unique (Rf 0,80) en chromatographie en couche mince sur gel de silice avec
15 un mélange n-hexane-chloroforme-acétate d'éthyl (5:5:1 en volume). Cette poudre incolore est reprise dans un petit volume de méthanol et on ajoute à la solution méthanolique de l'eau, par petites quantités, pour obtenir 129 mg d'aiguilles d'ébé lactone B. Ptf 77°C. Ce produit
20 cristallisé à un ID_{50} de 0,00035 mcg/ml vis-à-vis de l'estérase.

3 jours.

8 - Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comporte une quantité sûre et efficace d'au moins l'un des ébé lactones A et B selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, en mélange avec un support pharmaceutiquement acceptable.

9 - Stimulateur de défense de l'hôte pour l'augmentation de la réponse immunitaire chez un animal vivant, caractérisé en ce qu'il est la composition pharmaceutique selon la revendication 8.

10 - Composition anti-inflammatoire pour le traitement des inflammations chez un animal vivant, caractérisée en ce qu'elle est la composition pharmaceutique selon la revendication 8.