

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 18610

(54) Nouvelle substance antibiotique à base de dihydro-3,4 hydroxy-4(hydroxy-3 pyridyl-2)-5 méthyl-4 2H-pyrrdécarboxamide-2, utile notamment comme médicament et procédé de sa préparation utilisant une nouvelle souche de micro-organisme.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 D 401/04; A 61 K 31/44.

(22) Date de dépôt..... 27 août 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *EUA*, 27 août 1979, n° 70,287.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 10 du 6-3-1981.

(71) Déposant : Société dite : E. R. SQUIBB & SONS, INC., résidant aux EUA.

(72) Invention de : Richard B. Sykes, Jerry S. Wells et Wen-Chih Liu.

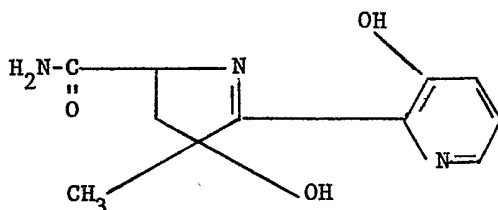
(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Beau de Loménie,
55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

La présente invention concerne une nouvelle substance antibiotique utile notamment comme médicament et un procédé de sa préparation utilisant une nouvelle souche de micro-organisme.

5 Plus particulièrement, l'invention concerne une nouvelle substance antibiotique appelée EM 4940 qui est active contre une gamme de bactéries gram positif et gram négatif, de levures, de champignons, d'acholéplasmes et contre le protozoaire Trichomonas vaginalis. On produit cette nouvelle substance antibiotique EM 4940
10 par culture d'une souche du micro-organisme Nocardia sp. 11 340 qui a été déposée à l'American Type Culture Collection sous la référence ATCC n° 31531.

La structure chimique de l'EM 4940, qui est l'antibiotique de l'invention, a été déterminée par radio-cristallographie et elle est la suivante :
15



20 ce composé est donc le dihydro-3,4 hydroxy-4 (hydroxy-3 pyridyl-2)-5 méthyl-4 2H-pyrrolocarboxamide-2. L'EM 4940 est un mélange de deux antibiotiques, l'isomère trans-2,4 et l'isomère cis-2,4, que l'on a respectivement appelés EM 4940A et EM 4940B.

D'autres caractéristiques et avantages de l'in-
25 vention seront mieux compris à la lecture de la description qui va suivre de plusieurs exemples de réalisation et en se référant aux dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1 illustre le spectre d'absorption ultraviolette de l'EM 4940A et de l'EM 4940B dans le méthanol,
30 l'absorbance étant représentée en ordonnées et la longueur d'onde (nm) en abscisses;

- la figure 2 illustre le spectre infrarouge de l'EM 4940A et de l'EM 4940B dans le bromure de potassium, l'absorbance étant représentée en ordonnées et le nombre d'onde (cm^{-1}) étant

représenté sur l'échelle inférieure des abscisses et la longueur d'onde (μm) sur l'échelle supérieure;

- la figure 3 illustre le spectre de résonance magnétique nucléaire de l'EM 4940A dans du deutérochloroforme contenant deux gouttes de deutérométhanol, la fréquence (Hz) étant représentée sur l'échelle supérieure des abscisses et le paramètre δ (ppm) étant représenté sur l'échelle inférieure des abscisses;

- la figure 4 illustre le spectre de résonance magnétique nucléaire de l'EM 4940B dans du deutérochloroforme contenant deux gouttes de deutérométhanol, avec les mêmes échelles que la figure 3.

Le micro-organisme

Le micro-organisme que l'on utilise pour produire l'EM 4940 est une souche de Nocardia sp. SC 11 340. On peut obtenir une culture secondaire de ce micro-organisme en s'adressant à la collection permanente de l'American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Son numéro d'immatriculation dans cette souchothèque est ATCC n° 31531. En plus du micro-organisme particulier décrit et caractérisé ici, il est évident que l'on peut également cultiver des mutants de ce micro-organisme (par exemple des mutants produits par emploi des rayons X, des rayons ultraviolets ou de moutardes à l'azote) pour produire l'EM 4940.

On peut isoler Nocardia sp. 11 340 ATCC n° 31531, d'un échantillon de sol humide le contenant en appliquant tout d'abord l'échantillon de sol à un milieu ayant la composition suivante :

	KNO_3	1 g
	K_2HPO_4	0,5 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
	NaCl	0,5 g
30	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
	Glucose	5 g
	Gélose	20 g
	Eau distillée	1 litre.

On stérilise au préalable le milieu dans un autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Après 14 jours d'incubation à 28°C , on isole les colonies de Nocardia sp. SC 11 340 de la culture. On

cultive ces colonies isolées sur un milieu ayant la composition suivante :

	extrait de levure	1 g
	extrait de boeuf	1 g
5	NZ Amine A (hydrolysate de caséine)	2 g
	glucose	10 g
	gélose	15 g
	eau distillée	1 litre
10	On ajuste le pH du milieu à 7,3 et on autoclave à 121°C pendant 30 minutes.	

Nocardia sp. SC 11 340 produit un mycélium végétatif qui se fragmente en forme en bâtonnets et en cocci en 5 jours. Les cellules ne sont pas acido-résistantes et sont gram positif.

Les colonies qui se développent sur un milieu solide ont une consistance lisse à pâteuse et une couleur blanc grisâtre. Sur gélose à l'asparagine et au glycérol, elles ne présentent pas de caractéristiques distinctives; sur gélose à la farine d'avoine et à la purée de tomate, il se forme un pigment pourpre solide qui pénètre dans le milieu solide. Il ne se forme pas de mycélium aérien.

Les hydrolysats acides de parois cellulaires entières analysés selon la méthode de Becker et coll., Applied Microbiology, 12 : 421 (1964), indiquent la présence d'acide mésodiaminopimélique, de galactose et d'arabinose comme composants glucidiques principaux. Une certaine quantité de ribose est présente mais pas de madurose. Cette analyse des parois cellulaires correspond au Type IV A (Lechevalier et coll. dans The Actinomycetales, H. Pranssen (Ed.), VEB Gustav Fischer Verlag pp 398-400, 402 (1970)) et établit le diagnostic du genre Nocardia.

Pour déterminer s'il se forme des produits acides à partir de divers hydrates de carbone en présence de Nocardia sp. SC 11 340, on cultive ce micro-organisme pendant 10 jours sur le milieu de base de Ayers, Rupp et Johnson, Bull. U.S. Dept. Agri., n° 782 (1919), en présence des hydrates de carbone suivants et on obtient les résultats indiqués :

	Milieu de base (témoin) -	Glycérol +
	Adonitol -	Inositol +
	Arabinose +	Lactose -
	Cellobiose -	Maltose +
5	Erythritol -	Mannitol +
	Glucose +	Mannose -
	Mélezitose -	Xylose -
	Mélibiose -	Fructose +
	Raffinose -	Saccharose -
10	Rhamnose -	Sorbitol -
	Tréhalose -	

Légende : + : formation d'acide

- : pas de formation d'acide

Nocardia sp. SC 11 340 décompose la caséine et

- 15 l'hypoxanthine mais non la tyrosine, la xanthine et la guanine. On observe une hydrolyse de la gélatine mais non de l'amidon.

L'antibiotique

L'antibiotique EM 4940 qui est l'antibiotique de l'invention peut être obtenu par culture de Nocardia sp. SC 11 340 ATCC

- 20 n° 31531 à une température d'environ 28°C en conditions aérobies submergées dans un milieu de culture aqueux contenant un hydrate de carbone assimilable et une source d'azote. On effectue la fermentation jusqu'à ce que le milieu ait une activité antibiotique importante ce qui correspond généralement à une durée de 120 à 144 heures et de
- 25 préférence d'environ 144 heures.

- On peut séparer l'EM 4940 du milieu de fermentation et le purifier selon des techniques connues dans l'art. Par exemple on peut centrifuger le bouillon pour séparer le mycélium puis concentrer sous pression réduite. Sinon on peut filtrer pour éliminer
- 30 le mycélium du bouillon. On peut précipiter la matière non active du concentré par emploi par exemple de méthanol puis la rejeter. L'extraction du concentré par l'acétate d'éthyle enlève la majeure partie de l'activité. On peut concentrer l'extrait, l'appliquer à une colonne de chromatographie, par exemple une colonne constituée
- 35 d'acide silicique et de cellulose, et éluer l'antibiotique EM 4940

par le chloroforme. On peut cristalliser l'EM 4940 dans l'acétonitrile. Les cristaux sont sous deux formes (A) des petites tables et (B) des aiguilles. L'activité biologique de la forme A est supérieure à celle de la forme B. Les deux formes sont des diastéréoisomères et on ne peut généralement pas les différencier par le spectre ultraviolet, le spectre infrarouge et le spectre de masse ni par l'analyse élémentaire. La résonance magnétique nucléaire protonique permet de différencier les deux isomères, la forme A ayant un pic C-CH₃ à 1,75 ppm tandis que la forme B a un pic C-CH₃ à 1,65 ppm. Un mélange des formes A et B présente deux pics et l'intégration de ces pics permet d'évaluer le pourcentage de chacune des formes dans l'échantillon. On peut pour séparer les deux formes, effectuer une cristallisation fractionnée dans l'acétonitrile.

L'EM 4940 (dihydro-3,4 hydroxy-4 (hydroxy-3 pyridyl-2)-5 méthyl-4 2H-pyrrolocarboxamide-2) a deux atomes de carbone asymétriques, l'atome portant la fonction carboxamide et l'atome portant les radicaux méthyle et hydroxy. Par conséquent, le dihydro-3,4 hydroxy-4 (hydroxy-3 pyridyl-2)-5 méthyl-4 2H-pyrrolocarboxamide-2 existe sous deux formes diastéroisomères ou sous forme de leur mélange racémique. Toutes ces formes rentrent dans le cadre de l'invention.

La détection de l'EM 4940 repose sur un essai biologique de diffusion qui utilise le milieu suivant.

Seed Agar BBL	30,5 g
NaCl	5 g
eau distillée	1 litre

On stérilise le milieu à 121°C pendant 20 minutes.

On ensemence des boîtes de gélose contenant des concentrations non inhibitrices de diumycine avec E. coli SC 10 888. Dans ces conditions EM 4940 inhibe E. coli SC 10 888.

L'invention est illustrée par les exemples non limitatifs suivants.

Exemple 1

On prépare un lot de fermentation de 250 l de Nocardia sp. SC 11 340 ATCC n° 31531 dans un récipient en acier inoxydable de 400 l par emploi des milieux et des conditions opératoires décrits ci-après.

Stade 1 On entretien Nocardia sp. SC 11 340 sur le milieu gélosé (A) stérilisé suivant :

	farine d'avoine	20 g
	purée de tomate	20 g
5	gélose	15 g
	eau du robinet qsp	1 litre

On ajuste le pH du milieu à 7,0 et on stérilise à 121°C pendant 15 minutes. On met en suspension une anse de culture en surface sur gélose inclinée (milieu (A)) de Nocardia sp. SC 11 340 ATCC n° 31531 dans 11 ml de solution à 0,01 % de dupanol et on l'utilise comme source d'inoculum pour ensemençer le milieu (B) stérilisé suivant.

	extrait de levure	4 g
	extrait de malt	10 g
15	glucose	4 g
	dau distillée qsp	1 litre

On ajuste le pH du milieu à 7,3 et on stérilise à 121°C pendant 15 minutes. On incube pendant 72 heures 1 500 ml de ce milieu dans un ballon de 4 litres sur un agitateur rotatif à 28°C (300 tr/min, course 5 cm).

Stade 2 Inoculum : 1,5 litre du stade 1.

On ajuste à 7,3 le pH de 28,5 litres du milieu B précédemment décrit et on stérilise à 121°C pendant 15 minutes. On ajoute au milieu stérilisé, 1,5 litre d'inoculum obtenu dans le stade 1 et on incube les 30 litres pendant 72 heures. Pendant l'incubation on aère le bouillon à raison de 65 l/min en agitant à 220 tr/min.

Stade 3 Inoculum : 12,5 litres du stade 2.

Comme décrit dans le stade 2, on prépare 237,5 l du milieu B précédemment décrit et on les combine à 12,5 litres d'inoculum du stade 2. On incube les 250 litres de matière pendant 144 heures. Pendant l'incubation, on agite le bouillon à 155 tr/min et on l'aère à raison de 283 l/min.

Après élimination du mycélium par centrifugation, on obtient 185 litres de bouillon. On concentre le bouillon limpide sous pression réduite à une température égale ou inférieure à 45°C

pour obtenir environ 3,25 litres. On verse lentement le concentré dans 25 litres de méthanol en agitant pendant 30 minutes, on centrifuge le mélange et on rejette le précipité inactif. On concentre le surnageant sous pression réduite à une température égale ou inférieure à 45°C pour obtenir environ 1,8 litre, la majeure partie du méthanol étant alors éliminée. On extrait ensuite le concentré 4 fois avec 0,5 volume d'acétate d'éthyle. On combine les extraits dans l'acétate d'éthyle et on concentre sous pression réduite à une température égale ou inférieure à 45°C pour obtenir environ 100 ml contenant plus de 90 % de l'activité. On charge le concentré d'acétate d'éthyle sur une colonne (43 x 70 cm) garnie d'un mélange acide silicique/cellulose (2/1 en poids), le garnissage ayant été effectué avec du chloroforme.

On élue la colonne avec du chloroforme. On recueille environ 3 litres de matière active que l'on concentre à sec pour obtenir 11 à 12 g de matière. On cristallise cette matière dans l'acétonitrile pour obtenir 4,1 g d'EM 4940 cristallin.

Les cristaux d'EM 4940 sont sous deux formes (A) des petites tables et (B) des aiguilles. L'activité biologique de la forme A est supérieure à celle de la forme B. Les deux formes sont des diastéromères et on ne peut pas les différencier par le spectre ultraviolet, le spectre infrarouge, le spectre de masse ou l'analyse élémentaire. La résonance magnétique protonique permet de différencier les deux isomères, la forme A ayant un pic C-CH₃ à 1,75 ppm tandis que la forme B a un pic C-CH₃ à 1,65 ppm. Un mélange des formes A et B présente deux pics et l'intégration des pics permet d'évaluer le pourcentage de chaque constituant de l'échantillon. Les 4,1 g d'EM 4940 obtenus ci-dessus contiennent 80 % de forme A et 20 % de forme B. Pour séparer les deux formes on dissout l'échantillon dans l'acétonitrile. La forme B est plus soluble et la forme A précipite donc en premier; on isole de l'échantillon 1,8 g de forme A pure à 97 %.

On a déterminé que la forme A de l'EM 4940 (petites tables) était un isomère de type trans-2,4 dihydro-3,4 hydroxy-4 (hydroxy-3 pyridyl-2)-5 méthyl-4 2H-pyrrolicarboxamide-2 qui a les caractéristiques suivantes :

1) point de fusion : 165-168°C

2) soluble dans le méthanol, 1'éthanol, 1'acétate d'éthyle, 1'acétone et le chloroforme. Insoluble dans 1'hexane et 1'eau.

3) spectre ultraviolet (comme illustré par la figure 1)

$\lambda_{\max}$ - 206 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ - 480)

$\lambda_{\max}$ - 315 nm ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ - 220)

4) spectre infrarouge (comme illustré par la figure 2)

5) spectre de résonance magnétique nucléaire (comme illustré par la figure 3)

6) spectrométrie de masse : ion moléculaire = 235

formule brute = $C_{11}H_{13}N_3O_3$

7) analyse élémentaire

Eléments	Trouvée	Théorique pour $C_{11}H_{13}N_3O_3$
C	56,14 %	56,22 %
H	5,44 %	5,58 %
N	17,66 %	17,88 %
cendres	0	

8) pouvoir rotatoire $\alpha_D = + 20^\circ$ dans le méthanol.

On a déterminé que la forme B de 1'EM 4940 (aiguilles) était un isomère de type cis-2,4 dihydro-3,4 hydroxy-4 (hydroxy-3 pyridyl-2)-5 méthyl-4 2H-pyrrolocarboxamide-2 ayant les caractéristiques suivantes :

1) point de fusion : 200-201°C

2) spectre infrarouge (comme illustré par la figure 2)

3) spectre de résonance magnétique nucléaire (comme illustré par la figure 4)

4) spectrométrie de masse : ion moléculaire = 235

formule brute $C_{11}H_{13}N_3O_3$

5) analyse élémentaire

Eléments	Trouvée	Théorique pour $C_{11}H_{13}N_3O_3$
C	56,38 %	56,22 %
H	5,60 %	5,58 %
N	17,78 %	17,88 %
cendres	0	

Exemple 2

On entretient Nocardia sp. SC 11 340 ATCC n° 31531 sur le milieu gélosé (A) stérilisé suivant :

5	farine d'avoine	20 g
	purée de tomate	20 g
	gélose	15 g
	eau du robinet qsp	1 litre

On ajuste le pH du milieu à 7,0 et on autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

10 On utilise une anse de culture superficielle sur gélose inclinée (milieu A) de Nocardia sp. SC 11 340 ATCC n° 31531 pour ensemer chacun de six erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml du milieu (B) stérilisé suivant :

15	extrait de levure	4 g
	extrait de malt	10 g
	glucose	4 g
	eau distillé qsp	1 l

On ajuste le pH du milieu à 7,3 avant de stériliser à 121°C pendant 15 minutes. On incube ensuite les erlenmeyers à 28°C sur un agitateur rotatif (300 tr/min; course 5 cm) pendant environ 72 heures. Après cette incubation, on enseme avec la culture à raison de 5 % en volume 100 erlenmeyers de 500 ml contenant chacun 100 ml de milieu (B) stérilisé comme précédemment décrit.

25 Après ensemencement, on incube les erlenmeyers à 28°C sur un agitateur rotatif (300 tr/min course 5 cm) pendant environ 120-144 heures. On regroupe alors le contenu des erlenmeyers et on centrifuge le bouillon pour obtenir environ 9 litres de surnageant.

On extrait l'antibiotique selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1.

30 En plus des milieux de fermentation utilisés dans les exemples ci-dessus, on peut citer les milieux suivants comme exemples d'autres milieux utiles pour la production de l'EM 4940 et qui peuvent remplacer le milieu B dans les exemples ci-dessus.

10

Milieu C

	<u>Grammes</u>
extrait de levure	4
extrait de malt	10
5 glucose	25
eau distillée qsp	1 litre

On ajuste le pH à 7,3 avant de stériliser à 121°C

pendant 15 minutes.

Milieu D

	<u>Grammes</u>
10 glycérol	30
Pharmamedia	20
extrait de levure	20
glucose	20
15 eau distillée qsp	1 litre

On ajuste le pH à 7,3 avant de stériliser à 121°C

pendant 15 minutes.

Milieu E

	<u>Grammes</u>
20 extrait de levure	4
extrait de malt	10
glucose	10
glycérol	2
eau distillée	1 litre

25 On ajuste le pH à 7,3 avant de stériliser à 121°C

pendant 15 minutes.

Milieu F

	<u>Grammes</u>
glycérol	10
30 L-asparagine	5
KH_2PO_4	1
Na_2HPO_4	2
glucose	50
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
35 eau du robinet qsp	1 litre

On ajuste le pH à 7,3 avant de stériliser à 121°C

pendant 15 minutes.

Milieu G

	<u>Grammes</u>
40 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
L-asparagine	5
glucose	50
glycérol	10
KH_2PO_4	7
45 K_2HPO_4	7
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
eau distillée qsp	1 litre

On ajuste le pH à 7,3 avant de stériliser à 121°C

pendant 15 minutes.

Essais biologiques

A) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'EM 4940A et de l'EM 4940B vis-à-vis de micro-organismes selon un essai en aérobiose.

5 1. Emploi de la gélose BA-2

On prépare l'antibiotique dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,0 à la concentration de 1 000 µg/ml. On prépare des dilutions de raison 2 dans du bouillon de Mueller Hinton pour obtenir une gamme allant de 1 000 µg/ml à 0,5 µg/ml. On introduit 1 ml de
10 chaque dilution dans des boîtes de Pétri de 100 x 15 mm auxquelles on ajoute 9,0 ml de gélose BA-2. La concentration finale de l'antibiotique dans la gélose est comprise entre 100 µg/ml et 0,05 µg/ml.

On cultive tous les micro-organismes dans environ 15 à 20 ml de bouillon pour essai des antibiotiques (AA) (Bacto
15 antibiotic medium n° 3 de Difco) en ensemençant chaque bouillon avec une anse de micro-organisme cultivé sur gélose inclinée BHI. On incube les tubesensemencés à 37°C pendant 18-20 heures. On vérifie la pousse de chaque bouillonensemencé par essai turbidimétrique visuel avec un standard McFarland n° 5 et on ajuste en fonction du
20 résultat avec du bouillon AA (un standard McFarland n° 5 équivaut à environ 1×10^9 UFC/ml; UFC = unité formant une colonie). On effectue le contrôle visuel immédiatement avant l'emploi. On étudie ensuite le bouillon ajusté correspondant à chaque micro-organisme avec la quantité d'inoculum appropriée. Pour cette série d'essai,
25 la quantité d'inoculum est de 10^4 UFC. On dilue le bouillon de culture au 1/100 avec du bouillon AA pour obtenir une concentration de 10^7 UFC/ml. On applique ensuite les micro-organismes aux boîtes de gélose avec un inoculateur Denley Multi Point Inoculator appliquant 0,001 ml de culture pour obtenir des inoculums de 10^4 UFC.
30 La CMI est la concentration minimale de l'antibiotique qui inhibe le développement d'au moins trois colonies.

Les résultats de cet essai figurent dans le tableau I
ci-dessous.

TABLEAU I

	Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) EM4940A
5	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8 333	50,0
10	<i>Enterobacter cloacae</i>	10 459	> 100,0
	<i>Escherichia coli</i>	10 404	100,0
	<i>Escherichia coli</i>	10 857	50,0
15	<i>Escherichia coli</i>	10 896	25,0
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	10 436	100,0
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11 066	50,0
	<i>Proteus morganii</i>	9 774	50,0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 754	> 100,0
25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 330	50,0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 545	25,0
30	<i>Salmonella typhimurium</i>	9 201	50,0
	<i>Serratia marcescens</i>	9 782	100,0
	<i>Serratia marcescens</i>	1 111	> 100,0
35	<i>Shigella sonnei</i>	8 449	50,0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2 400	> 100,0

TABLEAU I (suite)

Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice (μ g/ml) EM4940A
5 Staphylococcus aureus	10 165	50,0
Staphylococcus aureus	11 239	>100,0
Streptococcus faecalis	9 011	>100,0

10 On effectue d'autres essais selon le mode opératoire ci-dessus ; les résultats de ces essais figurent dans le tableau II ci-dessous.

TABLEAU II

15 Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice (μ g/ml)	
		EM4940A	EM4940B
Staphylococcus aureus	2 400	>200	>200
20 Staphylococcus aureus	10 165	100	100
Staphylococcus aureus	11 239	50	100
Staphylococcus aureus	2 661	>200	>200
25 Streptococcus faecalis	9 011	>200	>200
Escherichia coli	10 404	50	50
30 Escherichia coli	10 857	50	50
Salmonella typhimurium	9 201	50	50
Klebsiella aerogenes	10 436	50	50

TABLEAU II (suite)

Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$)	
		EM4940A	EM4940B
K. pneumoniae	11 066	50	50
5 Proteus rettgeri	8 217	50	50
P. morganii	9 774	100	100
Serratia marcescens	9 782	50	50
10 Serratia marcescens	11 111	100	100
Pseudomonas aeruginosa	9 545	12,5	12,5
Pseudomonas aeruginosa	8 754	100	100
15 Pseudomonas aeruginosa	9 330	> 200	> 200
Acinetobacter calcoaceticus	8 333	100	100
20 Enterobacter cloacae	10 459	50	100
Shigella sonnei	8 449	50	50

2. Emploi de la gélose synthétique H-59

On reprend le mode opératoire précédemment décrit, si
 25 ce n'est qu'on remplace la gélose BA-2 par la gélose H-59. Les résultats obtenus figurent dans le tableau III ci-dessous.

TABLEAU III

Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$)
		EM 4940A
30 Acinetobacter calcoaceticus	8 333	25,0
Enterobacter cloacae	10 459	100,0
35 Escherichia coli	10 404	50,0

TABLEAU III (suite)

	Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice (μ g/ml) EM 4940A
5	<i>Escherichia coli</i>	10 857	25,0
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	10 436	50,0
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11 066	50,0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 754	>100,0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 330	50,0
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 545	25,0
	<i>Salmonella typhimurium</i>	9 201	50,0
20	<i>Serratia marcescens</i>	9 782	100,0
	<i>Serratia marcescens</i>	11 111	100,0
	<i>Shigella sonnei</i>	8 449	50,0
25	<i>Streptococcus faecalis</i>	9 011	>100,0

B) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de EM4940A vis-à-vis des micro-organismes selon un essai en anaérobiose.

30 On prépare l'antibiotique comme précédemment décrit pour l'essai en aérobiose.

On entretient tous les micro-organismes dans des tubes de bouillon glucosé à la viande hachée fourni par Scott Laboratories de Rhode Island. Deux jours avant l'essai, on transfère 0,1 ml de la culture entretenue dans un nouveau tube de bouillon à la viande
35 hachée et on incube à 37°C pendant 48 h. Après 48 h d'incubation, on considère que chaque culture s'est développée à 1×10^8 UFC/ml.

On applique les micro-organismes sur des boîtes de gélose contenant l'antibiotique (gélose de Mueller Hinton BBL + 5 % de sang total de mouton + 0,2 % de sang hémolysé de mouton) avec une valeur de l'inoculum de 10^5 UFC.

- 5 Après ensemencement, on place les boîtes dans une enceinte de culture anaérobie munie d'un sachet générateur de gaz (BBL) et on incube à 37°C pendant 18 h. La CMI est la concentration minimale d'antibiotique inhibant le développement d'au moins trois colonies.

10 Les résultats de cet essai figurent dans le tableau IV ci-dessous.

TABLEAU IV

	Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice (μ g/ml) EM4940A
15	Bacteroides fragilis	9 005	50,00
	Bacteroides fragilis	9 844	12,50
20	Bacteroides fragilis	10 277	50,00
	Bacteroides fragilis	10 278	50,00
	Bacteroides fragilis	10 279	50,00
25	Bacteroides fragilis	10 281	50,00
	Bacteroides fragilis	11 085	100,00
30	Bacteroides fragilis	11 086	50,00
	Bifidobacterium dentium	11 260	>100,00
	Clostridium histolyticum	8 572	12,50
35	Clostridium perfringens	11 256	50,00
	Clostridium septicum	1 780	12,50

TABLEAU IV (suite)

	Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) EM4940A
5	<i>Clostridium sporogenes</i>	2 372	12,50
	<i>Eubacterium lentum</i>	11 261	12,50
10	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	11 338	12,50
	<i>Hemophilus vaginalis</i>	8 568	100,00
	<i>Hemophilus vaginalis</i>	9 640	100,00
15	<i>Peptococcus variabilis</i>	11 264	50,00
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	11 263	50,00
20	<i>Propionibacterium acnes</i>	4 020	50,00

C) Détermination de la concentration minimale inhibitrice de EM4940A vis-à-vis de Candida albicans

La veille de l'essai, on prépare des bouillons de culture d'une nuit de Candida albicans dans du bouillon F4 et du
 25 bouillon levure-azote (YNB). Le bouillon de culture d'une nuit contient environ $1,0 \times 10^7$ UFC/ml. On dilue les deux cultures à 10^{-3} avec le bouillon correspondant ; on prépare l'antibiotique à la concentration de 2 mg/ml dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,0. On dilue la solution-stock au 1/8 pour obtenir la solution A et on
 30 dilue la solution A au 1/8 pour obtenir une solution B (dilution au 1/64).

On répartit les solutions d'antibiotique dans des tubes à essai stériles de 13 x 100 mm avec des pipettes de Khan (0,2 ml) selon le tableau suivant.

Tube	Addition	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
1	0,2 ml de solution-stock	100
2	0,1 ml de solution-stock	50
3	0,05 ml de solution-stock	25
5 4	0,2 ml de solution A (1/8 de la solution-stock)	12,5
5 5	0,1 ml de solution A (1/8 de la solution-stock)	6,3
10 6	0,05 ml de solution A (1/8 de la solution-stock)	3,1
7	0,2 ml de solution B (1/64 de la solution-stock)	1,6
8	0,1 ml de solution B (1/64 de la solution-stock)	0,8
15 9	0,05 ml de solution B (1/64 de la solution-stock)	0,4
10 10	Témoin de culture positive (pas de composé)	-

On introduit dans chacun des tubes 4,0 ml des bouillons de culture dilués au 10^{-3} pour obtenir un inoculum final de 10^4 UFC/ml.

On incube les tubes à 37°C pendant 18 h. On note ensuite les résultats de la façon suivante :

+ culture comparable à celle du tube témoin,
 + culture inférieure à celle du tube témoin,
 - pas de culture visible.

La CMI est la concentration minimale en antibiotique pour laquelle on obtient un tube négatif. Les résultats de cet essai figurent dans le tableau V ci-dessous.

TABLEAU V

Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, INC.	Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$)	
		Milieu F_4	Milieu : base levure-azote + glucose
Candida albicans	5314	>100	>100

D) Détermination de la concentration minimale inhibitrice de
EM4940A vis-à-vis de dermatophytes

On prépare une solution à 1 mg/ml de l'antibio-
tique dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,0. On prépare des dilu-
5 tions de raison 2, dans le bouillon pour obtenir une gamme des
concentrations d'antibiotique comprise entre 1000 μ g/ml et 0,5 μ g/ml.

On cultive toutes les souches de micro-organismes
sur gélose F4 inclinée. On lave chaque gélose inclinée avec 10 ml de
tampon phosphate 0,1 M à pH 7,0. On transfère les suspensions de
10 spores dans des tubes bouchés de Morton stériles (1 x 4) et on homo-
généise les suspensions.

On ensemence en surface les boîtes de gélose pré-
parées avec 0,2 ml de la suspension de spores appropriée. On étale
sur la surface de la gélose avec un écouvillon stérile. On incube les
15 boîtes ensemencées à 26°C pendant 48 h.

La CMI est la dilution maximale dans chaque série
pour laquelle on n'observe pas de culture. Les résultats des essais
figurent dans le tableau VI ci-dessous.

TABLEAU VI

20	Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice (μ g/ml) EM4940A
	T. mentagrophytes	2 637	>100
	E. floccosum	9 185	>100
25	T. rubrum	9 199	50
	M. canis	9 237	100

E) Détermination de la concentration minimale inhibitrice de
EM4940A vis-à-vis de Trichomonas vaginalis

On prépare des dilutions de l'antibiotique comme
30 décrit en C). A chaque série de dilutions, on ajoute 4 ml d'une dilu-
tion au 1/100 d'une culture de 40 h de T. vaginalis (cultivé sur du
milieu de Diamond modifié à pH 6,0 + 10 % de sérum de lapin).

On incube les tubes en anaérobiose à 37°C pendant
40 h et on détermine la CMI. Les résultats de cet essai figurent dans
35 le tableau VII ci-après.

TABLEAU VII

Micro-organisme	Numéro dans la collection de E. R. Squibb & Sons, Inc.	Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$) EM4940A
5 Trichomonas vaginalis	8 560	12,5

F) Détermination de la concentration minimale inhibitrice de
EM4940A vis-à-vis de mycoplasmes

On dissout 1 mg de l'antibiotique dans 200 μl
10 de diméthylsulfoxyde. On réalise douze dilutions de raison 2 avec
du DMSO pour obtenir des concentrations comprises entre 5 000 et
2,49 $\mu\text{g/ml}$.

Dans deux ensembles de plaques de microtitration,
on introduit en triple des portions de 5 μl de chaque concentration.
15 On ensemence chacun des godets avec 250 μl de dilution à 10 % de
culture de M. mycoides ou de A. laidlawii dans du bouillon de
Channocks. On ferme les plaques de façon étanche et on les examine
après 48 h à 37°C pour rechercher le virage du rouge au jaune du
rouge de phénol et la CMI est la concentration la plus faible pour
20 laquelle on n'observe pas de virage.

Les résultats de l'essai figurent dans le
tableau VIII ci-dessous.

TABLEAU VIII

Micro-organisme	CMI ($\mu\text{g/ml}$) de EM4940A
25 Mycoplasma mycoides	> 100
Acholeplasma laidlawii	100

Comme le montrent les expériences ci-dessus, les
antibiotiques de l'invention sont actifs vis-à-vis d'une grande di-
versité de bactéries gram positif et gram négatif, de levures, de
30 champignons, d'acholéplasmes et du protozoaire Trichomonas vaginalis.
On peut donc utiliser ces antibiotiques 1) comme désinfectants de
l'environnement (par exemple sous forme d'une pulvérisation ou d'une
poudre en association avec un véhicule approprié) et 2) comme médi-
caments pour lutter contre des infections dues aux bactéries, levures,
35 champignons, acholéplasmes et Trichomonas vaginalis précités chez
diverses espèces de mammifères (par exemple par voie locale, orale

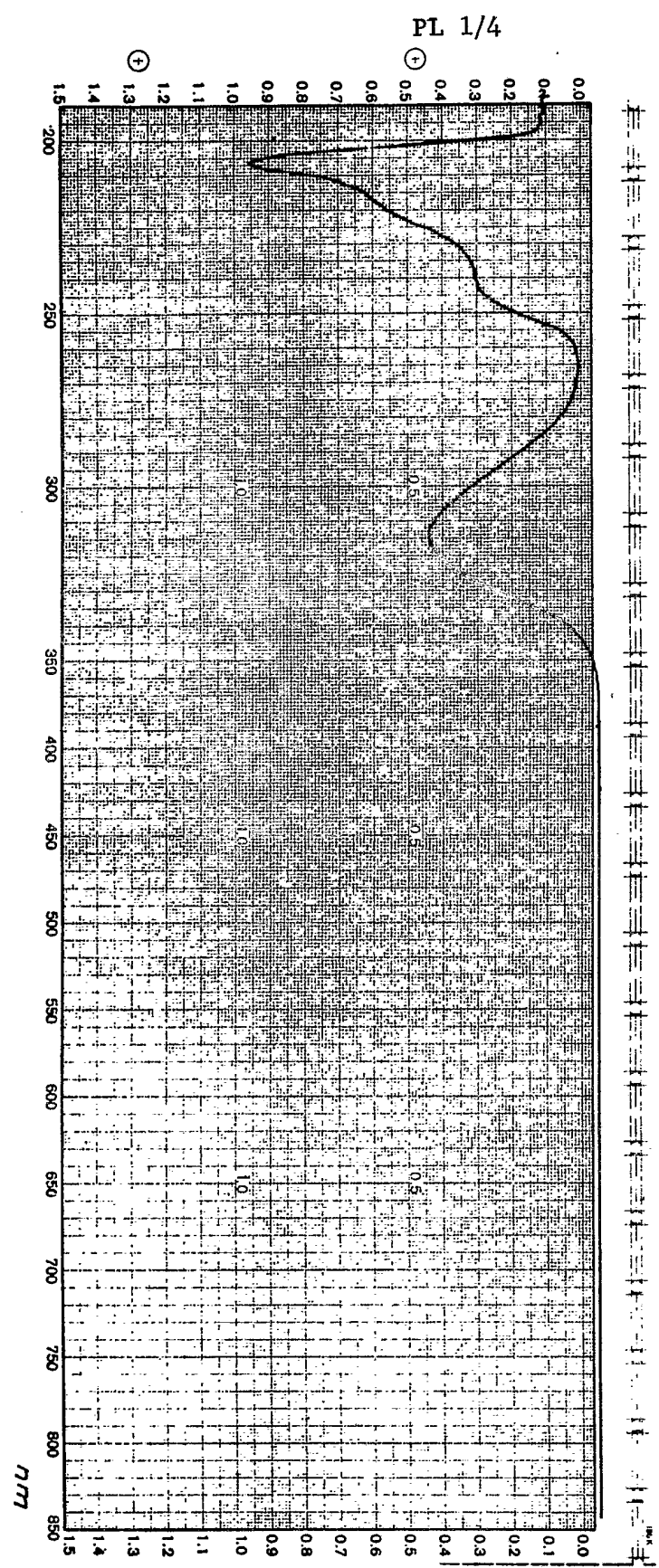
ou parentérale, en association avec des véhicules, excipients, etc.,
convenant en pharmacie.

Bien entendu, diverses modifications peuvent être apportées
par l'homme de l'art aux dispositifs ou procédés qui viennent d'être
5 décrits uniquement à titre d'exemples non limitatifs sans sortir du
cadre de l'invention.

R E V E N D I C A T I O N S

1. Nouveau composé utile notamment comme antibiotique, caracté-
risé en ce qu'il consiste en le dihydro-3,4 hydroxy-4 (hydroxy-3
pyridyl-2)-5-méthyl-4 2H-pyrrolecaboxamide-2 ou un de ses stéréo-
5 isomères.
2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il
consiste en le trans-2,4 dihydro-3,4 hydroxy-4 (hydroxy-3 pyridyl-2)-5
méthyl-4 2H-pyrrolecaboxamide-2.
3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il
10 consiste en le cis-2,4 dihydro-3,4 hydroxy-4 (hydroxy-3 pyridyl-2)-5
méthyl-4 2H-pyrrolecaboxamide-2.
4. Procédé pour préparer un composé selon l'une quelconque des
revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver
Nocardia sp. 11 340 ATCC n° 31 531 dans un milieu nutritif aqueux
15 contenant un hydrate de carbone assimilable et une source d'azote assi-
milable, en conditions aérobies submergées jusqu'à ce que le milieu
ait une activité antibiotique notable.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'on
cultive le micro-organisme à environ 28°C.
- 20 6. Culture biologiquement pure du micro-organisme Nocardia sp.
11 340, ayant les caractéristiques d'identification de l'ATCC n° 31531,
cette culture pouvant produire un composé selon l'une quelconque
des revendications 1 à 3, en une quantité récupérable par fermenta-
tion dans un milieu nutritif aqueux contenant un hydrate de carbone
25 assimilable et une source d'azote assimilable.
7. Nouveaux médicaments utiles notamment comme antibiotiques,
caractérisés en ce qu'ils consistent en un composé selon l'une
quelconque des revendications 1 à 3.
8. Compositions thérapeutiques, caractérisées en ce qu'elles
30 contiennent comme ingrédient actif l'un au moins des médicaments
selon la revendication 7.
9. Formes pharmaceutiques d'administration par voie locale,
orale ou parentérale des compositions thérapeutiques selon la re-
vendication 8.

FIGURE 1



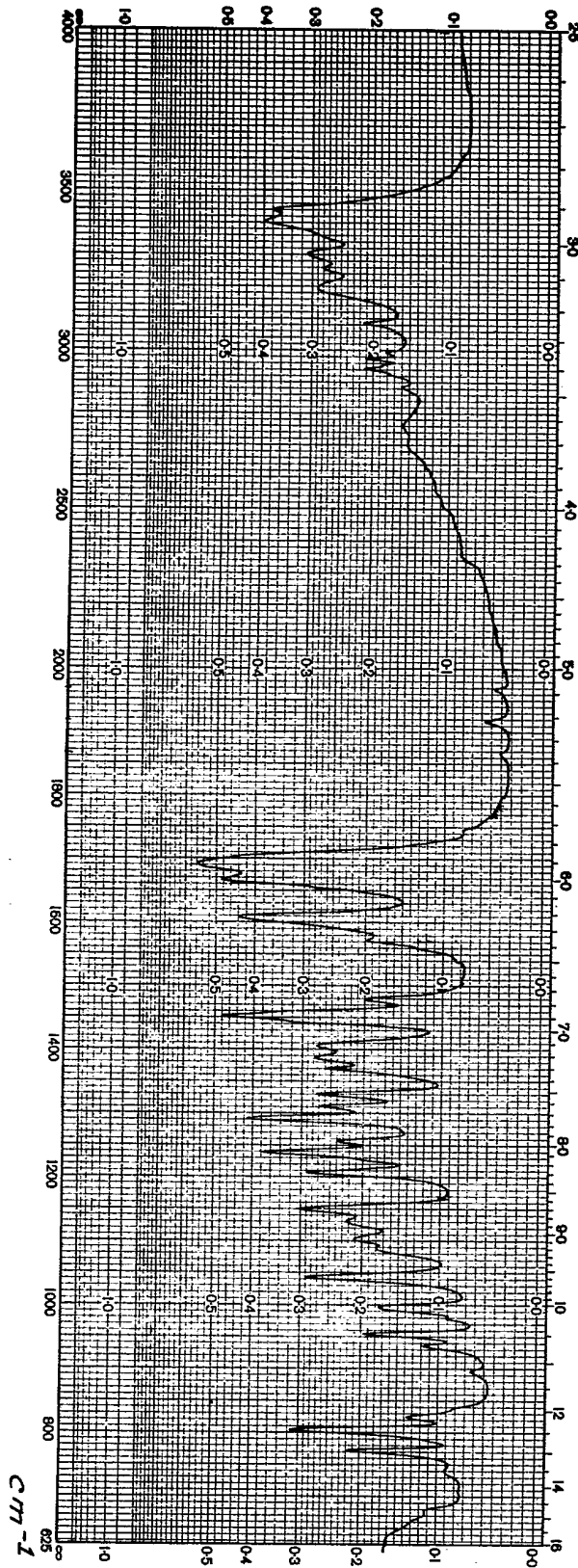


FIGURE 2

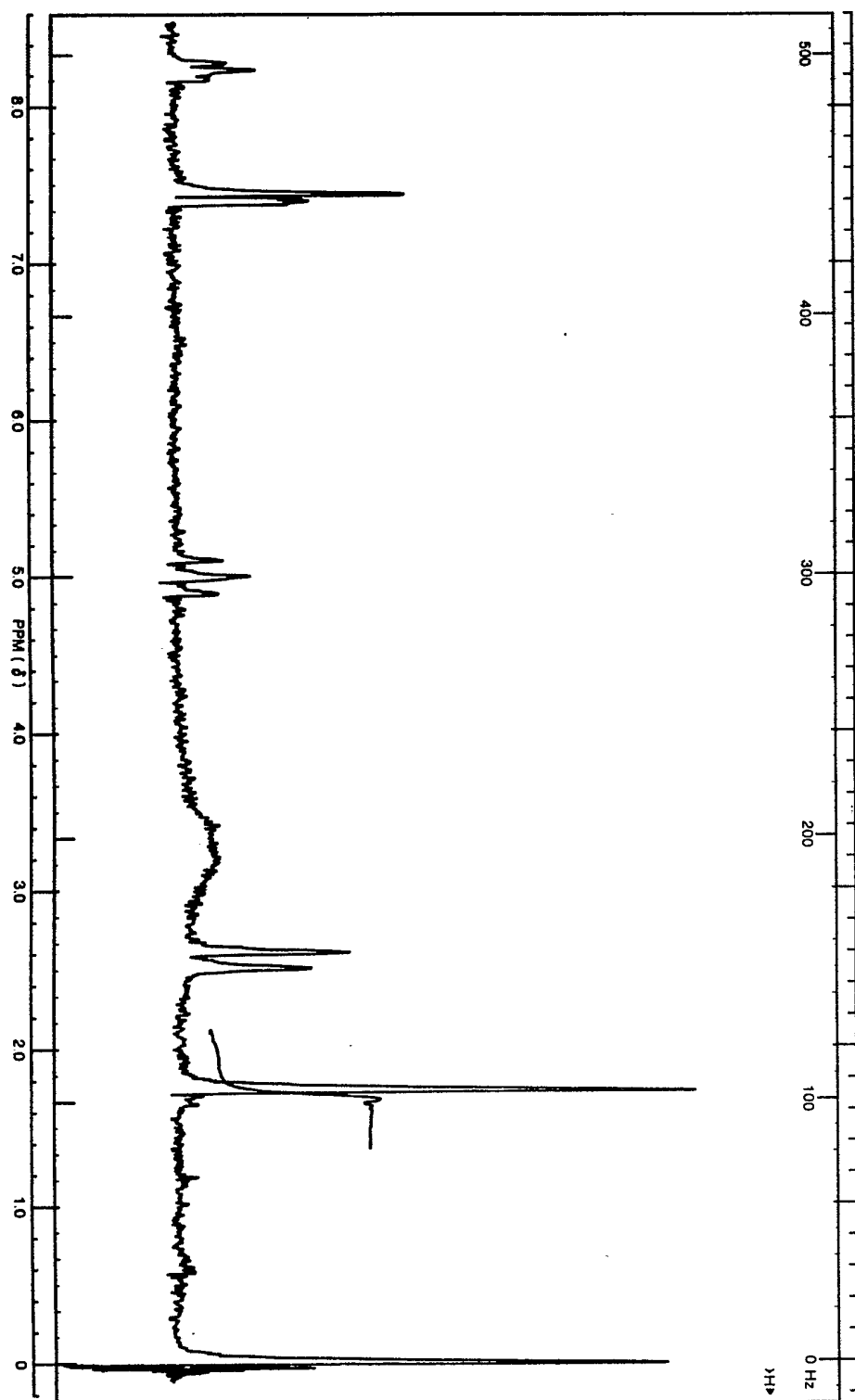


FIGURE 3

FIGURE 4

