



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

N° 883.593

Classif. Internat.: C 07 G / C 07 D

Mis en lecture le: A 01 N

02 -12- 1980

Le Ministre des Affaires Économiques,

*Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;**Vu la Convention d'Union pour la Protection de la Propriété Industrielle;**Vu le procès-verbal dressé le 2 juin 19780 à 10 h. 00*

au Service de la Propriété industrielle;

ARRÊTE :

Article 1. — Il est délivré à la Sté dite : ELI LILLY AND COMPANY,
307 East McCarty Street, Indianapolis, Indiana 46206
(Etats-Unis d'Amérique)

repr. par Langner Parry, c/o Mr. Frank Seifert, 77 Frans
De Ceusterlei, Schoten 2120

un brevet d'invention pour : Nouveaux antibiotiques, leur préparation
et leur utilisation thérapeutique,

(Inv. : K.H. Michel)

qu'elle déclare avoir fait l'objet de demandes de brevet
déposées aux Etats-Unis d'Amérique le 8 juin 1979,
n° 046.875 et le 1er février 1980, n° 117.739 au nom
de K.H. Michel dont elle est l'ayant cause.

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

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

Bruxelles, le 2 décembre 1980

PAR DÉLÉGATION SPÉCIALE :

Le Directeur

L. SALPETEUR

003500

BREVET D'INVENTION

Nouveaux antibiotiques, leur préparation et leur utilisation.

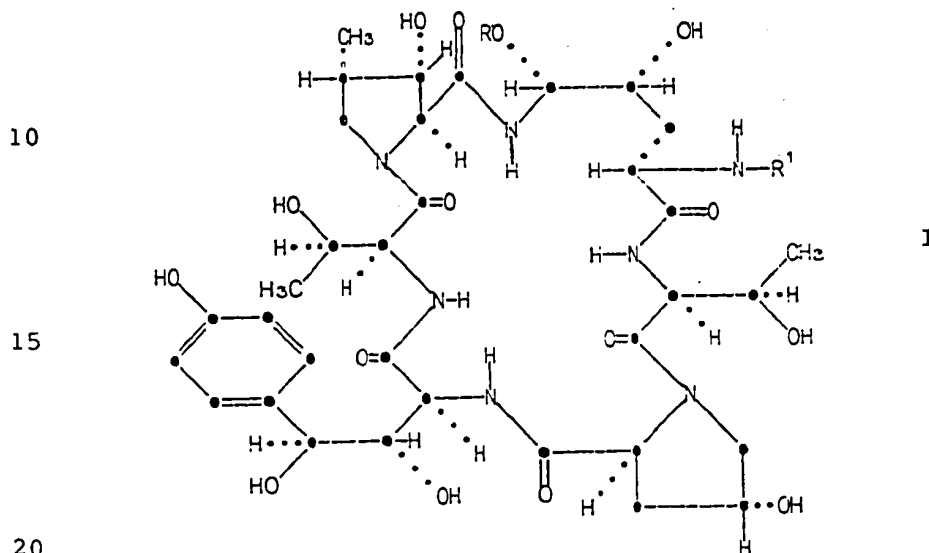
Société dite : ELI LILLY AND COMPANY . .

Priorité Conventionnelle des demandes de brevets n° 046.875
et 117.739 déposées aux Etats-Unis d'Amérique les 8 juin 1979
et 1er février 1980 par Karl Heinz MICHEL.

S. (Inv. K.H. Michel)

He

Cette invention concerne le facteur H de A-30912, un nouveau facteur antibiotique isolé du mélange antibiotique A-30912, les homologues à groupement éther alkylique inférieur du facteur H de A-30912 et les dérivés tétrahydrogénés des 5 homologues de ce nouveau facteur. Ces nouveaux composés ont la formule développée I :



dans laquelle R^1 est un groupement linoléoyle ou stéaroyle et R est un groupement alkyle en C_1-C_6 , pourvu que, quand R est un groupement méthyle, R^1 soit un groupement linoléoyle. Quand R^1 est un groupement linoléoyle et R est un groupement méthyle, le composé est le facteur H de A-30912 ; quand R^2 est un groupement stéaroyle et R est un groupement méthyle, le composé est le facteur H tétrahydrogéné de A-30912.

On prépare ces composés en faisant réagir le facteur A de A-30912 ou le facteur A de A-30912 tétrahydrogéné avec l'alcool approprié. Les dérivés tétrahydrogénés peuvent également être préparés en réduisant le composé linoléoylique correspondant.

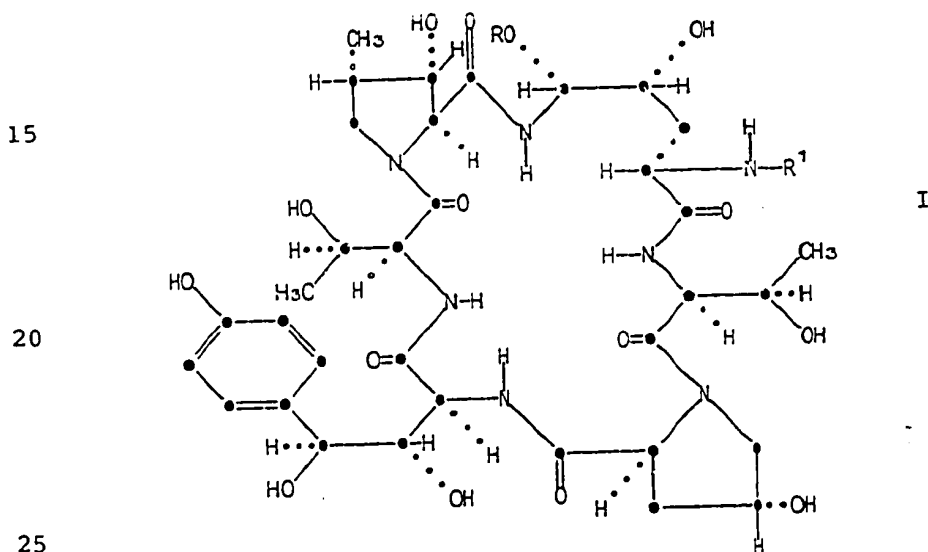
Le mélange antibiotique A-30912 est décrit par Marvin M. Hoehn et Karl H. Michel dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.245. Avant la présente invention, on avait trouvé sept facteurs distincts dans le mélange A-30912. Ces facteurs étaient appelés facteurs A, B, C, D, E, F et H de A-30912. La nouvelle substance antibiotique de cette invention a été appelée facteur H

Mc

de A-30912. Pour des raisons de commodité, le facteur H de A-30912 sera désigné ci-après A-30912H ; et A-30912H, ses homologues alkylés inférieurs et leurs dérivés tétrahydrogénés seront appelés antibiotiques de type A-30912H.

5 Le but de cette invention est la description d'antibiotiques de type A-30912 de formule I et leur procédé de préparation à partir du facteur A de A-30912 ou du facteur A tétrahydrogéné de A-30912. Les antibiotiques de type A-30912H sont particulièrement utiles comme agents antifongiques.

10 Cette invention fournit un antibiotique A-30912H qui a la formule développée :



dans laquelle R^1 est un groupement linoléoyle ou stéaroyle et R est un groupement alkyle en C_1-C_6 , pourvu que, quand R est un

30 groupement méthyle, R^1 soit un groupement linoléoyle.

Cette invention fournit également un procédé de préparation d'un antibiotique de type A-30912H qui a la formule développée I, décrite précédemment, où R^1 est un groupement linoléoyle ou stéaroyle et R est un groupement alkyle en C_1-C_6 ,

35 pourvu que, quand R est un groupement méthyle, R^1 soit un groupement linoléoyle, caractérisé en ce qu'on fait réagir un composé de formule II

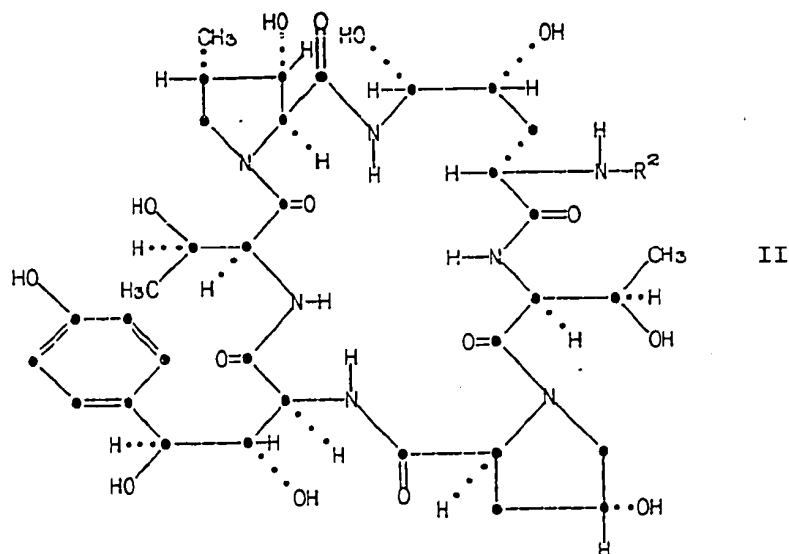
ne

88353

3

5

10



15 dans laquelle R^2 est un groupement linoléoyle ou stéaroyle

A) quand R^2 est un groupement linoléoyle, avec

1) un alcool de formule ROH où R est tel que défini précédemment ; ou

2) un alcool de formule R^3OH où R^3 est un groupement alkyle en C_2-C_6 ;

20

B) quand R^2 est un groupement stéaroyle, avec un alcool de formule R^3OH ;

dans un solvant inerte polaire ou dans un excès de l'alcool réactif à $0^\circ C-70^\circ C$ dans des conditions acides ; et quand on fait

25 réagir l'alcool R^3OH avec un composé de formule II où R^2 est un groupement linoléoyle, on réduit éventuellement le groupement linoléoyle du composé résultant en un groupement stéaroyle.

Cette invention fournit également une composition pharmaceutique qui contient comme ingrédient actif un

30 antibiotique de type A-30912H qui a la formule développée I décrite précédemment, associé à un support approprié pharmaceutiquement acceptable.

Cette invention fournit également un antibiotique de type A-30912H qui a la formule développée I décrite

35 précédemment, utilisé comme agent fongique pour traiter les infections fongiques chez les mammifères par administration d'une quantité efficace de cet agent.

Le mélange antibiotique A-30912 duquel est isolé le

Mc

000000

4

nouveau facteur antibiotique de cette invention, est produit par culture d'une souche de Aspergillus rugulosus NRRL 8113 dans des conditions de fermentation aérobie en immersion, comme décrit dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.245. Un autre procédé de préparation de A-30912H est la culture de Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440 pour obtenir le mélange antibiotique A-42355 et isoler A-30912H de ce mélange. Ce procédé est décrit dans la demande de brevet déposée le même jour que la présente demande et portant le N°

10 Le spectre d'absorption infrarouge du facteur H de A-30912, en pastille de KBr, est donné sur la Figure 1 des dessins annexés.

La Figure 2 des dessins annexés résume les déplacements relatifs des facteurs de A-30912 en chromatographie sur couche mince, en utilisant du gel de silice (Merck-Darmstadt) comme adsorbant, un système solvant 3:2 d'acétate d'éthyle et de méthanol et un bioautographe par Candida albicans pour la détection. La flèche indique le sens de l'écoulement du solvant ; le signe "+" indique le point d'origine. La zone où l'on peut voir les facteurs mineurs E, F et G est indiquée par un crochet. On trouvera des comparaisons spécifiques des R_f entre le facteur A de A-30912 et les facteurs mineurs E, F et G dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.245 (voir le Tableau I dans la colonne 4).

Cette invention concerne de nouveaux agents antifongiques. Ces agents comprennent A-30912H, un facteur nouvellement découvert dans le mélange antibiotique A-30912, les homologues alkyliques inférieurs de A-30912H et les dérivés tétrahydrogénés de ces homologues. Cette invention concerne également l'utilisation du facteur A-30912H tétrahydrogéné en tant qu'agent antifongique. Les dérivés tétrahydrogénés de A-30912H et de ses homologues sont préparés par réduction de ces composés.

Le mélange antibiotique A-30912 peut être préparé comme décrit dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.245 qui est incorporé ici par voie de référence. Le mélange antibiotique A-30912 peut également être préparé par culture de Aspergillus nidulans var. roseus, NRRL 11440, comme décrit ici.

A-30912H est un nouveau facteur du mélange antibiotique

nc

000000

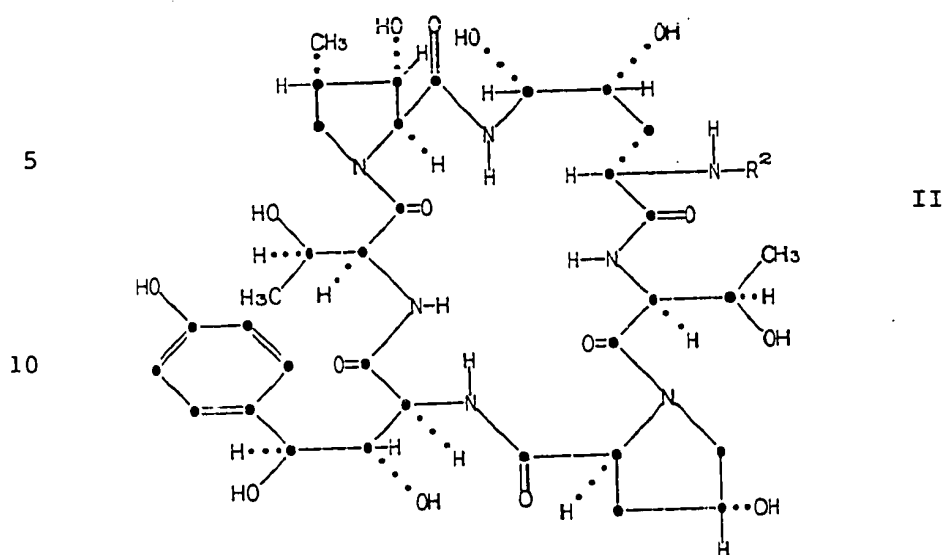
5

A-30912. L'expression "mélange antibiotique" telle qu'elle est utilisée dans le domaine de la fermentation et dans cette description désigne un mélange de facteurs antibiotiques différents produits simultanément. Comme le verra l'homme de l'art, le rapport des différents facteurs produits dans un mélange antibiotique variera selon les conditions de fermentation utilisées. Dans les conditions connues jusqu'à présent, A-30912H est un facteur mineur du mélange A-30912, et est présent en quantités comprises entre 0,01 et 1,0 % du mélange total. Un autre facteur mineur du mélange A-30912 a été détecté mais il n'a pas été isolé en quantité suffisante pour sa caractérisation. Le facteur H de A-30912 est séparé pour le mieux de ce facteur par CCM sur gel de silice en utilisant comme mélange solvant un mélange 3:2 d'acétate d'éthyle et de méthanol ou un mélange 95:5 d'acétonitrile et d'eau. Dans l'un ou l'autre système, le facteur mineur est plus polaire que les autres facteurs de A-30912.

A. Facteur H de A-30912

Le facteur H de A-30912, composant nouvellement découvert du mélange antibiotique A-30912, est un antibiotique polypeptidique qui est tout à fait similaire au facteur A de A-30912. Il a récemment été montré que le facteur A de A-30912 est identique à l'échinocandine B [voir F. Benz et al., Helv. Chim. Acta 57, 2459-2477 (1974)] et le brevet suisse N° 568.386 (Derwent Abstract 75884W)]. L'antibiotique SL 7810/F a également été identifié comme étant l'échinocandine B [voir C. Keller-Juslen, et al., Tetrahedron Letters 1976 (46), 4147-4150, et le brevet belge N° 834.289 (Derwent Abstract 30159X)]. Keller-Juslen, et al., ont proposé les formules 2 et 3 pour l'échinocandine B (SL 7810/F ; facteur A de A-30912) et son dérivé tétrahydrogéné respectivement :

91C



2 R^2 = linoléoyle : échinocandine B

3 R^2 = stéaroyle : tétrahydro-échinocandine B

L'analyse élémentaire du facteur H de A-30912

correspond particulièrement bien à la formule brute de

20 $C_{53}H_{83}N_7O_{16} \cdot H_2O$ (calculée : C, 58,30 ; H, 7,79 ; N, 8,98 ; O, 24,93).

Le spectre d'absorption infrarouge du facteur H de A-30912, en pastille de KBr, est donné sur la Figure 1 des dessins annexés. On observe les maxima d'absorption

25 caractéristiques suivants : 2,9 (très fort), 3,4 (fort), 3,5 (moyen), 5,9-6,1 (très fort), 6,6 (fort), 6,9 (fort), 7,9-8,1 (moyen) et 9,1 (fort) microns.

Le spectre d'absorption ultraviolet du facteur H de A-30912 dans le méthanol neutre et dans le méthanol acide

30 présente des maxima d'absorption à 223 (ϵ 13 100) et 275 nm, pic large (ϵ 2 100). Le spectre ultraviolet du facteur H de A-30912 dans le méthanol basique présente des maxima d'absorption à 245 nm (ϵ 14 700) et 290 nm, pic large (ϵ 3 500) et également une absorption finale.

35 Le spectre de résonance magnétique nucléaire de ^{13}C du facteur H de A-30912 dans le perdeutérométhanol présente les caractéristiques suivantes :

δ 176,07, 174,15, 173,49, 172,56, 172,47, 169,88, 158,45,

133,01, 130,90, 129,52, 129,04, 116,21, 82,15, 77,00, 75,98,
75,71, 71,27, 69,55, 69,42, 68,22, 62,44, 58,69, 57,25, 56,81,
56,08, 52,88, 51,32, 39,08, 38,60, 36,89, 32,65, 30,77, 30,45,
30,26, 28,18, 27,14, 26,55, 20,11, 19,60, 11,33.

- 5 Le facteur H de A-30912 a les pouvoirs rotatoires approximatifs suivants :

$$[\alpha]_D^{25} - 40^\circ \text{ (c, 0,5, CH}_3\text{OH)}$$

$$[\alpha]_{365}^{25} - 151^\circ \text{ (c 0,5, CH}_3\text{OH)}$$

10

Le titrage électrométrique du facteur H de A-30912 dans le diméthylformamide aqueux à 66 % indique la présence d'un groupement titrable avec un pK_a d'environ 12,90 (pH initial 7,12).

15

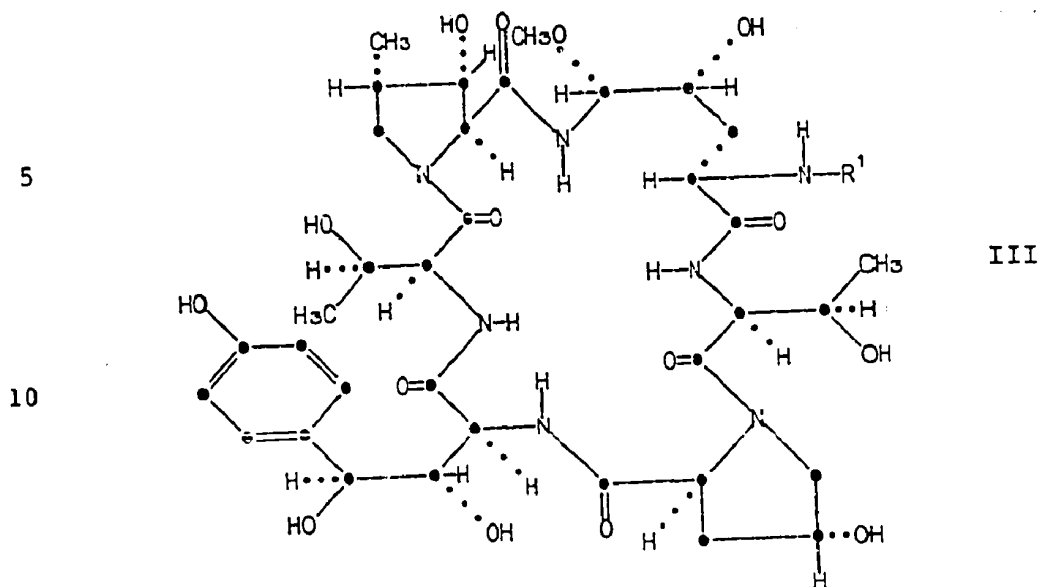
Le facteur H de A-30912 est soluble dans divers solvants organiques comme le méthanol, l'éthanol, le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde et l'acétate d'éthyle, mais il est insoluble dans les solvants organiques non polaires comme l'éther diéthylique et l'éther de pétrole. Le facteur H de

- 20 A-30912 est également soluble dans les solutions aqueuses, en particulier celles ayant un pH supérieur à 7,0.

Le facteur H de A-30912 (poids moléculaire 1073) diffère du facteur A de A-30912 (poids moléculaire 1059) de seulement 14 unités de masse. Les deux composés sont très similaires en ce qui concerne leurs propriétés physico-chimiques et les deux composés produisent de l'acide linoléique par hydrolyse. A-30912H a un groupement $-\text{CH}_2-$ supplémentaire qui est présent sous forme de $-\text{O}-\text{CH}_3$, remplaçant l'un des groupements $-\text{OH}$ de la partie peptide cyclique de la molécule.

30

A-30912H et A-30912H tétrahydrogéné ont les formules 4 et 5 respectivement :



4 R¹ = linoléoyle

5 R¹ = stéaroyle

B. Homologues du facteur H de A-30912

Après la découverte de la structure du facteur H de A-30912, le fait que les dérivés alkyliques inférieurs (C₂-C₆) du facteur H de A-30912 seraient des produits utiles a été apprécié. Avant ce moment, les dérivés éther alkylique inférieur du facteur A de A-30912 qui avaient été préparés n'avaient pas été considérés comme ayant un but utile mais étaient préparés seulement comme outils de détermination de la structure. Les homologues éther alkylique inférieur du facteur H de A-30912 sont préparés à partir du facteur A de A-30912.

Le facteur A de A-30912 peut être produit par fermentation de : 1) une souche de Aspergillus rugulosus NRRL 8113 comme décrit dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.245 ; 2) une souche de Aspergillus nidulans NRRL 8112 comme décrit dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.246 ; 3) une souche de Aspergillus nidulans var. echinulatus A-32204, NRRL 3860 comme décrit dans le brevet suisse N° 568.386 ; ou 4) une souche de Aspergillus rugulosus NRRL 8039 comme décrit dans le brevet belge N° 834.289. Un autre procédé de préparation du facteur A de A-30912 par fermentation d'Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440 est décrit dans la demande mentionnée page 4 ligne 9.

Le facteur H de A-30912 est isolé du mélange antibiotique A-30912. Le mélange A-30912 peut être préparé comme décrit dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.245.

5 Le facteur H de A-30912 peut également être isolé à partir du mélange A-42355. Le mélange A-42355 est préparé en cultivant une nouvelle variété d'Aspergillus nidulans, appelée A. nidulans var. roseus, tel que décrit ici. Cette culture a été déposée le 26 février 1979 et fait partie de la collection
10 permanente de culture du Northern Regional Research Center U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research, Peoria, Illinois 61604, où elle est disponible au public sous le N° NRRL 11440.

15 La culture de Aspergillus nidulans var. roseus que l'on utilise pour produire les antibiotiques A-30912 a été étudiée et caractérisée par Thomas H. Sands des Lilly Research Laboratories.

Pour des raisons de commodité, cette nouvelle culture sera appelée ici culture A42355. La base taxonomique d'après laquelle cette culture a été classée comme une nouvelle variété d'Aspergillus nidulans est décrite dans les paragraphes suivants. Dans cette discussion, les termes "ISCC-NBS" désignent les noms de couleurs selon la méthode ISCC-NBS (K.L. Kelly et D.B. Judd, 25 "The ISCC-NBS Methods of Designating Colors and A Dictionary of Color Names", U.S. Department of Commerce, Circ. 553, Washington, D.C., 1955). Le terme "Maerz et Paul" désigne les blocs de couleur décrits par A. Maerz et M.R. Paul dans "Dictionary of Color", McGraw-Hill Book Company, New York, N.Y., 1950.

30 Les comparaisons sont basées sur le travail de K.B. Raper et D.I. Fennel, "The Genus Aspergillus", Williams and Wilkins, 1965.

Mc

donne une surface grêlée. La bordure est fortement crénelée à lobée et nettement délimitée, ne présentant qu'une rare culture périphérique sous la surface. Au fur et à mesure que la colonie vieillit, la variation de pigmentation provoque un effet de zones. La surface du verso apparaît concave et en contact avec la gélose seulement sur la périphérie. Un pigment soluble rose est produit. La nappe mycélienne est très tenace et ne produit pas d'odeur distinctive. La pigmentation chez les colonies jeunes est influencée par les conidies immatures qui sont jaune verdâtre pâle (ISCC-NBS 101 et Maerz et Paul 11-K-1). Cette couleur est éventuellement confinée à la périphérie de la colonie. Au bout de 10 jours, des masses sous-sphériques de cellules enveloppes enfermant des cléistothécia pourpre noirâtre sont réparties dans toute la colonie, mais sont plus nettement rassemblées au centre. Au bout de 21 jours, la bordure étroite, légèrement aplatie est jaune verdâtre grisâtre (ISCC-NBS 105 et Maerz et Paul 12-I-2). A l'intérieur de cette bordure, la colonie est rose jaunâtre moyen (ISCC-NBS 29 et Maerz et Paul 11-A-6), et la couleur est influencée par l'exsudat. Au bout de 21 jours, le centre est foncé par des conidies vert grisâtre et des cléistothécia pourpre noirâtre enfermées dans des cellules enveloppes. Le verso a une couleur qui va du brun clair (ISCC-NBS 57 et Maerz et Paul 13-A-7) à brun rougeâtre moyen (ISCC-NBS 43 et Maerz et Paul 6-F-9). En trois semaines ou plus, le verso a des teintes de pourpre très foncé, presque noir.

La tête conidienne au début est rayonnante et jaune vif, puis devient vert foncé et nettement en forme de colonne. Quand elles sont mûres, les têtes ont une longueur comprise entre 93,4 μ et 116,7 μ , et ont une dimension moyenne de 106 μ x 47 μ . Le vésicule a quelque peu une forme de spathe à une forme de poire et, comme le conidiophore, est brun clair. Les vésicules sont fertiles sur les deux tiers supérieurs et ont une dimension comprise entre 10 à 12 μ x 8 à 10 μ (taille moyenne 9,2 μ x 11,3 μ). Les conidiophores sont sinueux, lisses et à parois relativement épaisses. Ils ont une longueur comprise entre 88 μ et 112 μ (moyenne 101 μ). Bien qu'ils aient une largeur comprise entre 4 et 6 μ , la plupart ont une largeur de 6 μ .

Les stérigmates sont bisériés, hyalins à brun clair

et sont à parois lisses. Les stérigmates primaires sont presque cunéiformes. Ils ont une longueur de $6,3 \mu$ à $10,3 \mu$ et une largeur de $2 \mu \times 3 \mu$ à leur endroit le plus large (taille moyenne : $9,3 \mu \times 2,7 \mu$). Les stérigmates secondaires ont une 5 forme comprise entre la forme ovoïde et la forme inverse d'une poire et ont une dimension comprise entre $5,5 \mu$ à $11,0 \mu \times 2,4$ à $3,2 \mu$ (dimension moyenne : $9,9 \mu \times 2,9 \mu$). Les conidies sont globuleuses, délicatement dépolies à piquantes et vert foncé. Elles ont un diamètre compris entre $2,4$ à $4,0 \mu$ avec une moyenne. 10 de $3,2 \mu$.

Sur une gélose d'extrait de malt à 35°C , il se produit en 7 jours une colonie d'un diamètre de 14 mm. Le diamètre de la colonie atteindra 30 mm en 21 jours. Initialement, la colonie comprend des hyphes aériens blancs. La formation de conidies se 15 produit dans la première semaine et la colonie crênelée, veloutée et relativement plate devient vert jaunâtre foncé (ISCC-NBS 137 et Maerz et Paul 24-J-6). La colonie apparaît être divisée en zones en raison de la présence d'anneaux concentriques de masses sphériques jaunes de cellules enveloppes qui entourent ou 20 enferment des cléistothécia pourpre foncé. L'état conidiogène sur la gélose d'extrait de malt ressemble à cet état sur la solution gélosée de Czapek, à l'exception des dimensions.

Les têtes conidiennes ont une longueur comprise entre 100μ et 170μ , et des dimensions moyennes de $138 \mu \times 50 \mu$. Les 25 conidiophores ont une longueur de 100μ à 210μ (182μ en moyenne) et ont une largeur de 6μ . Les vésicules vont de 8μ à $12 \mu \times 6 \mu$ à 12μ (dimensions moyennes : $12 \mu \times 9,2 \mu$). Les stérigmates primaires ont une dimension de $5,5 \mu$ à $8,7 \mu \times 2,4 \mu$ à $4,0 \mu$ (dimensions moyennes : $7,2 \mu \times 6,6 \mu$). Les stérigmates secondaires 30 ont des dimensions de $5,5 \mu$ à $10,3 \mu \times 2,0 \mu$ à $3,6 \mu$ (dimensions moyennes : $7,4 \mu \times 3,5 \mu$). Les conidies ont un diamètre de $2,3$ à $3,2 \mu$, mais en moyenne un diamètre de $3,2 \mu$.

L'état ascogène est similaire sur les deux géloses. De nombreuses cléistothécia pourpre foncé sont incrustées dans 35 des cellules enveloppes globuleuses à sous-globuleuses, à parois épaisses de couleur hyalin à jaune pâle qui ont un diamètre de $12,6 \mu$ à $18,2 \mu$ (en moyenne $15,3 \mu$). Les cléistothécia sont globoides à sous-globoides et ont des parois

ayant jusqu'à trois couches d'épaisseur, la couche extérieure consistant en cellules pseudoparenchymateuses. Les cléistothécia ont un diamètre compris entre 140 μ à 800 μ , mais ont pour la plupart un diamètre compris entre 165 μ et 250 μ , 5 avec un diamètre moyen de 229 μ . Les asques hyalins à huit spores sont globoides à sous-globoides ou ellipsoïdiques de façon irrégulière. Quand ils sont globoides, ils ont un diamètre de 9,2 μ , avec peu d'écart par rapport avec cette dimension. Les asques ellipsoïdaux ont une dimension de 9,3 μ x 8,3 μ . Les 10 ascospores sont à pigment rouge orange, globoides quand ils sont vus superficiellement et en forme de lentilles quand ils sont vus latéralement. On peut voir sur le grand axe de la vue lenticulaire deux crêtes équatoriales parallèles, entières, délicatement plissées. Sur la vue de la surface, on voit une 15 seule crête qui est périphérique à la masse principale de spores, qui est lisse et de structure bivalve. La crête a une largeur de 0,5 μ ; la masse de spores a un diamètre de 4,4 μ . La dimension moyenne de la vue lenticulaire est de 4,7 μ x 3,7 μ .

Les conidies rugueuses vert jaunâtre, les têtes 20 conidiennes en forme de colonne, les conidiophores et les vésicules brun clair à parois lisses, les stérigmates bisériés et la production de cellules enveloppes à parois épaisses globoides placent la culture A42355 dans le groupe Aspergillus nidulans. Ces caractéristiques, combinées avec le fait que la 25 culture a un état ascogène dans lequel des cléistothécia globoides pourpre foncé sont fortement associées à des cellules enveloppes (comme précédemment) ou sont même enfermées dans ces cellules, et qu'elle a des ascospores lenticulaires rouge orange qui sont ornés de deux crêtes équatoriales parallèles plissées, 30 placent la culture A42355 dans le genre Emericella, l'état parfait du groupe A. nidulans.

A42355 ne satisfait pas complètement à la description de l'une quelconque des espèces ou variétés publiées du groupe A. nidulans. L'espèce la plus similaire à A42355 est A. nidulans 35 (Eidam) Wint., en se basant sur la culture type WB187 (NRRL 187). Ces cultures sont similaires par la couleur et le type des ascospores, mais diffèrent par la largeur des crêtes. Les cléistothécia sont similaires, mais la paroi de A42355 est formée

par plusieurs couches de cellules, au lieu d'une seule couche. Les deux cultures présentent un stade conidien prédominant vert jaune sur la gélose d'extrait de malt, mais l'état ascogène de A42355 est plus fortement évident que ne l'est celui de la culture type où il est partiellement caché par la culture et est de pigmentation terne. Dans les deux cultures, les hyphes, les conidiophores et les vésicules sont à paroi lisse, sans incrustation ; cependant, le vésicule de A42355 a une forme de spathe à une forme de poire, tandis que le vésicule de A. nidulans est hémisphérique. Des colonies de A42355 et de A. nidulans, quand elles sont cultivées sur de la solution gélosée de Czapek diffèrent par la vitesse de croissance, la production d'exsudat, l'abondance et la dimension des têtes conidiennes et dans la majeure partie des autres dimensions mesurées.

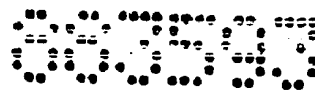
Bien qu'il existe des similitudes entre A42355 et A. nidulans (Eidam) Wint., il y a suffisamment de différences significatives pour que A42355 soit considéré comme une nouvelle variété que l'on a appelée A. nidulans var. roseus.

Culture de A. rugulosus NRRL 8113

Les conditions de culture de A. rugulosus NRRL 8113 sont décrites dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.245.

Culture de A. nidulans var. roseus

Le milieu de culture utilisé pour cultiver Aspergillus nidulans var. roseus peut être l'un quelconque d'un certain nombre de milieux. Pour des raisons d'économie dans la production, de rendement optimal et de facilité d'isolement du produit, on préfère cependant certains milieux de culture. Ainsi, par exemple, une source de carbone préférée dans une fermentation à grande échelle est l'huile de coton ou le glucose, bien que l'on puisse utiliser la mélasse, l'amidon, la dextrine, le lactose, le saccharose, le maltose, le glycérol, les acides gras, etc. Les sources préférées d'azote sont la caséine hydrolysée par voie enzymatique, la farine de soja et la peptone de viande soluble, bien que l'on puisse utiliser les grains de distillation, les nitrates, le glutamate monosodique, etc. Des sels minéraux nutritifs peuvent être incorporés dans les milieux de culture. Ils comprennent les sels solubles habituels pouvant fournir des ions sodium, magnésium, zinc, fer, calcium, ammonium, chlorure,



carbonate, sulfate, nitrate, phosphate, etc. Des oligo-éléments essentiels pour la croissance et le développement de l'organisme doivent également être inclus dans le milieu de culture. Ces oligo-éléments se trouvent fréquemment sous forme d'impuretés dans les autres constituants du milieu, en quantités suffisantes pour satisfaire les besoins de croissance de l'organisme.

Il peut être nécessaire d'ajouter de petites quantités (c'est-à-dire 0,2 ml/l) d'un agent antimoissant comme le polypropylèneglycol au milieu de fermentation à grande échelle si la formation de mousse pose des problèmes.

Pour la production d'une quantité substantielle du mélange antibiotique A-30912, on préfère la fermentation aérobie en immersion dans des réservoirs. De petites quantités du mélange antibiotique A-30912 peuvent être obtenues par culture en flacons agités. En raison du temps de latence de la production d'antibiotique couramment associé à l'inoculation de réservoirs importants avec la forme spore de l'organisme, il est préférable d'utiliser un inoculum végétatif. On prépare l'inoculum végétatif en inoculant un petit volume de milieu de culture avec la forme spore ou avec des fragments mycéliens de l'organisme pour obtenir une culture fraîche en croissance active de l'organisme. L'inoculum végétatif est ensuite transféré dans un réservoir plus grand. Le milieu utilisé pour la culture de l'inoculum végétatif peut être le même que celui utilisé pour les fermentations à plus grande échelle, mais on peut également utiliser d'autres milieux.

A. nidulans var. roseus peut être cultivé à des températures comprises entre 20° et 43°C ; l'organisme se développe le mieux à des températures d'environ 30 à 37°C. La production optimale du mélange antibiotique A-30912 se produit à des températures inférieures à 30°C.

Comme il est habituel dans les procédés de culture aérobie en immersion, on insuffle de l'air stérile dans le milieu de culture. Pour une production efficace de l'antibiotique, il doit y avoir une aération et une agitation suffisantes pour maintenir un taux d'oxygène dissous d'au moins 40 % de la saturation de l'air à la pression atmosphérique. L'agitation est

également utile pour briser la culture épaisse et lourde qui se forme pendant la fermentation.

La production du mélange antibiotique A-30912 peut être suivie pendant la fermentation en analysant des échantillons du bouillon fermenté ou des extraits alcooliques de la biomasse ou du bouillon entier pour déterminer l'activité antibiotique vis-à-vis d'un organisme dont on sait qu'il est sensible aux antibiotiques A-30912. Un organisme d'essai utile pour tester la présence des antibiotiques A-30912 est Candida albicans. Le dosage biologique est commodément effectué par dosage sur disque de papier ou sur puits de gélose sur des plaques de gélose ensemencées.

En général, on peut détecter l'activité antibiotique dès le second jour de la fermentation. La production maximale d'activité antibiotique se produit généralement entre environ le 6ème et le 8ème jour.

Le facteur H de A-30912 peut être identifié et séparé du reste du mélange A-30912 par CCM. Le gel de silice est un adsorbant préféré. La Figure 2 indique le déplacement relatif de A-30912H par rapport aux autres facteurs de A-30912 dans un système de CCM sur gel de silice.

Les R_f approximatifs des facteurs A, B, C, D et H de A-30912 dans différents systèmes solvants, en utilisant la CCM sur gel de silice (plaque N° 60 de gel de silice Merck-Darmstadt, 20 x 20 cm) et une bioautographe par Candida albicans, sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I

	Facteur de A-30912	R_f - Systèmes solvants			
		<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>
30	Facteur A	0,28	0,14	0,28	0,43
	Facteur B	0,39	0,21	0,42	0,47
	Facteur C	0,46	0,31	0,51	0,58
	Facteur D	0,50	0,38	0,57	0,61
	Facteur H	0,42	0,27	0,36	0,53
35					

Systèmes solvants

- a : acétate d'éthyle:méthanol (3:2)
b : acétate d'éthyle:méthanol (7:3)
c : acétonitrile:eau (95:5)
 5 d : acétate d'éthyle:éthanol:acide acétique (40:60:0,25)

Le facteur H de A-30912 peut être recueilli du milieu de fermentation par des procédés connus dans le domaine de la fermentation. Une récupération maximale est obtenue par extraction du bouillon entier. Il est préférable d'ajouter au
 10 bouillon entier un volume égal d'un solvant comme le méthanol et d'abaisser le pH du bouillon filtré à un pH d'environ 4-6, avant extraction. Le chloroforme est un solvant particulièrement avantageux pour extraire le facteur H de A-30912, bien que l'on puisse utiliser d'autres solvants similaires.

- 15 Le facteur H de A-30912 peut être isolé du mélange A-42355 ou A-30912 séparé, par chromatographie en utilisant divers adsorbants. Les adsorbants appropriés comprennent le gel de silice ; les résines à phases inversées, comme le gel de silice/C₈, le gel de silice/C₁₈, Quantum LP-1, ou LiChroprep
 20 RP-8 et RP-18 ; Florisil ; Sephadex G-25, LH-20 et G-15 ; l'alumine ; Diaion HP-20 ; Amberlite XAD-4 et X-384. Diaion est disponible chez Mitsubishi Chemical Industries, Tokyo, Japon ; les résines de type Amberlite sont disponibles chez Rohm et Haas Co., Philadelphie, Pensylvanie, USA ; les résines Sephadex
 25 sont disponibles chez Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède ; Florisil est disponible chez Floridin Co., Tallahassee, Florida, USA, et les gels de silice C/8 et C/18 sont disponibles chez E. Merck, Darmstadt, Allemagne. La préparation de gel de silice/C₁₈ de capacité de chargement élevée à partir de gel de
 30 silice LP-1 (Whatman) est décrite dans l'Exemple 6.

La chromatographie liquide sous faible pression de caractéristiques élevées en phase inversée (CLFP CE) en utilisant comme adsorbant du gel de silice/C₁₈ est un procédé préféré pour la purification finale des antibiotiques A-30912.
 35 Dans ce procédé, le mélange A-42355 ou A-30912 (obtenu par exemple par extraction du bouillon entier ou de mycéliums avec du méthanol ou du chloroforme), dissous dans un mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile, est placé sur une colonne

équilibrée avec le même solvant. La colonne est ensuite éluée avec le même solvant. Les fractions recueillies sont contrôlées par bioautographe par Candida albicans et/ou par UV (en se basant sur les temps de rétention relatifs). On réunit les 5 fractions contenant le facteur H de A-30912. Il est parfois nécessaire d'effectuer une séparation chromatographique supplémentaire pour obtenir le facteur H de A-30912 sous une forme purifiée.

Les facteurs A, B, D et H de A-30912 peuvent être 10 séparés par CLFPCE en utilisant les conditions suivantes :

	Colonne :	verre, 0,8 x 15,0 cm
	Garnissage :	Nucleosil 10-C ₁₈ (Machery Nagel and Company) ; garni en utilisant le
15		mode opératoire de garnissage en
		suspension de l'Exemple 8
	Solvant :	Mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et
		d'acétonitrile
	Volume de	
	l'échantillon :	8 µl
20	Dimension de	
	l'échantillon :	8 µg
	Température de la	
	colonne :	ambiante
	Débit :	1,8 ml/minute
25	Pression :	environ 14 bars
	Détecteur :	UV à 222 nm (ISCO Model 1800
		Variable Wavelength UV-Visible
		Absorbance Monitor)
30	Pompe :	LDC Duplex Minipump
	Injection :	injection sur boucle

Les durées de rétention approximatives pour les facteurs A, B, D et H de A-30912 dans ces conditions sont résumées dans le Tableau II.

TABLEAU II

	<u>Facteur de A-30912</u>	<u>Temps de rétention (s)</u>
	A	792
	B	870
5	H	990
	D	1 140

On peut préparer A-30912H tétrahydrogéné en utilisant des techniques d'hydrogénation classiques et en effectuant la réduction jusqu'à ce que les deux doubles liaisons de la chaîne latérale linoléoyle aient été réduites.

D. Préparation des homologues de A-30912H

On prépare les antibiotiques A-30912H de formule I dans lesquels R est un groupement alkyle en C_2-C_6 (c'est-à-dire les homologues de A-30912H) par réaction du facteur A de A-30912 ou de A-30912A tétrahydrogéné avec l'alcool correspondant approprié pour préparer le dérivé éther en C_2-C_6 désiré. Comme le facteur A de A-30912 est le composant principal des mélanges antibiotiques dans lesquels il est produit, ce procédé est également une façon préférée de préparer le facteur H de A-30912 et A-30912H tétrahydrogéné.

On peut préparer les homologues de A-30912H de formule I où R^1 est un groupement stéaroyle et R est un groupement alkyle en C_2-C_6 a) en préparant A-30912A tétrahydrogéné et en le faisant réagir avec l'alcool approprié pour former le dérivé éther, ou b) en faisant réagir le facteur A de A-30912 avec l'alcool approprié pour former le dérivé éther puis en réduisant les doubles liaisons de la chaîne latérale linoléoyle.

A-30912A tétrahydrogéné, A-30912H tétrahydrogéné et les composés de formule I où R^1 est un groupement alkyle en C_2-C_6 et R^1 est un groupement stéaroyle sont préparés à partir des facteurs A et H de A-30912 et à partir des composés de formule I où R est un groupement alkyle en C_2-C_6 et R^1 est un groupement linoléoyle, par des techniques d'hydrogénation classiques en effectuant la réduction jusqu'à ce que les deux doubles liaisons de la chaîne latérale linoléoyle aient été réduites.

Les antibiotiques de type A-30912H sont des agents antifongiques qui sont particulièrement actifs vis-à-vis de

l'espèce Candida. Cette invention concerne donc un procédé de traitement des infections fongiques chez les mammifères, qui consiste à administrer aux mammifères une quantité efficace de l'antibiotique de type A-30912H. Les résultats d'essais qui illustrent cette activité antifongique sont donnés dans les Tableaux III et IV. Dans ces essais, l'activité antifongique est mesurée par la méthode de diffusion sur disque (on plonge des disques de 6 mm dans des solutions contenant les composés d'essai ; on place les disques sur des plaques de gélose ensemencées avec l'organisme d'essai). Le Tableau III donne la concentration inhibitrice minimale (CIM) par disque, à laquelle A-30912H inhibe l'organisme d'essai.

TABLEAU III

	<u>Organisme d'essai</u>	<u>CIM (µg/disque)</u>
15	<u>Candida albicans</u>	1,25
	<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	0,078

Le Tableau IV donne les diamètres en mm des zones d'inhibition observées pour les dérivés types de type A-30912H. Les composés d'essai sont les composés de formule I où R¹ est un groupement linoléoyle ; les disques sont plongés dans des solutions contenant 10 mg/ml du composé d'essai.

TABLEAU IV

	<u>Organisme d'essai</u>	<u>Diamètres des zones (mm)</u>	
		<u>R = n-propyle</u>	<u>R = n-hexyle</u>
25	<u>Neurospora crassa</u>	20	25
	<u>Candida albicans</u>	16	14
	<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	35	35

En outre, dans des essais classiques de dilution sur gélose, A-30912H présente des CIM de 100 µg/ml vis-à-vis de Blastomyces dermatitidis et Histoplasma capsulatum.

Les antibiotiques de type A-30912H sont relativement non toxiques. Quand on les utilise comme agents antifongiques, on administre les antibiotiques de type A-30912H par voie parentérale et on les administre couramment avec un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable. La dose utilisée dépendra d'un certain nombre de conditions comme la nature et

000000

l'importance de l'infection particulière appliquée.

Pour illustrer cette invention plus complètement, on donne les exemples suivants :

EXEMPLE 1

5 Préparation du facteur H de A-30912 à partir du mélange A-42355

A. Fermentation en flacon agité

On prépare une culture d'Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440 et on la maintient sur une gélose inclinée de 18 x 150 ml, préparée avec un milieu ayant la composition

10 suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
	Glucose	5 g
	Extrait de levure	2 g
	CaCO ₃	3g
15	Jus de légumes**	200 ml
	Gélose***	20 g
	Eau désionisée	q.s. pour 1 litre

(pH initial 6,1)

** Jus V-8, Campbell Soup Co., Camden, N.J.

20 *** Meer Corp.

La culture inclinée est inoculée avec Aspergillus nidulans var. roseus NRRL 11440 puis on fait incuber la culture à 25°C pendant environ sept jours. On recouvre d'eau la culture inclinée mûre et on la gratte avec une anse stérile pour libérer

25 les spores. La suspension résultante est ensuite mise en suspension dans 10 ml d'eau désionisée stérile.

On utilise 1 ml de la culture inclinée en suspension pour inoculer 55 ml de milieu végétatif dans un flacon de 250 ml. Le milieu végétatif a la composition suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
30	Saccharose	25 g
	Mélasses noire	36 g
	Liqueur de macération de maïs	6 g
	Extrait de malt	10 g
35	K ₂ HPO ₄	2 g
	Hydrolysate enzymatique de caséine**	10 g
	Eau du robinet	1100 ml

Mc

(pH initial 6,5-6,7)

* N-2-Case, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J., U.S.A.

On fait incuber le milieu végétatif inoculé à 25°C pendant 48 heures, à 250 tours par minute, sur un agitateur de type rotatif. Après 24 heures, on homogénéise le milieu pendant une minute à faible vitesse dans un mélangeur (de type Waring), puis on le fait incubé à nouveau pendant les 24 heures restantes. Ou bien, on peut faire incubé le milieu végétatif inoculé pendant 48 heures puis l'homogénéiser pendant 15 secondes à faible vitesse.

Ce milieu végétatif incubé peut être utilisé pour inoculer un milieu de culture de fermentation en flacon agité ou pour inoculer un milieu végétatif de second stade. On peut également le conserver pour une utilisation ultérieure, en maintenant la culture dans la phase vapeur de l'azote liquide. On prépare la culture pour cette conservation dans de nombreuses petites ampoules, comme suit :

On mélange les cultures végétaives volume/volume avec une solution de suspension ayant la composition suivante :

20	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
	Glycérol	20 ml
	Lactose	10 g
	Eau désionisée	q.s. pour 100 ml

On répartit les suspensions préparées dans de petits tubes stériles à bouchon vissé (4 ml par tube). On conserve ces tubes dans la phase vapeur de l'azote liquide.

On peut utiliser une suspension conservée ainsi préparée pour inoculer des cultures inclinées ou des milieux d'ensemencement liquide. On fait incubé les cultures inclinées à 25°C à la lumière pendant 7 jours.

B. Fermentation en réservoir

Pour obtenir un plus grand volume d'inoculum, on utilise 10 ml de la culture végétative de premier stade incubé pour inoculer 400 ml d'un milieu de croissance végétatif de second stade ayant la même composition que celui du milieu végétatif. Le milieu de second stade est incubé dans un flacon Erlenmeyer à large ouverture de deux litres, à 25°C pendant 24 heures, sur un agitateur tournant d'un arc de 5 cm de diamètre à 250 tours par minute.

22

Le milieu de second stade incubé (800 ml), préparé comme décrit ci-dessus, est utilisé pour inoculer 100 litres d'un milieu de production stérile choisi parmi l'un des 5 suivants :

<u>MILIEU I</u>	
Ingrédient	Quantité
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,00455 g/l
Peptone de viande soluble*	30,5 g/l
10 Farine de soja	15,5 g/l
Dextrine de tapioca**	2,0 g/l
Mélasse noire	10,5 g/l
Hydrolysate enzymatique	
de caséine***	8,5 g/l
15 Na ₂ HPO ₄	4,5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,5 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g/l
Huile de coton	40,0 ml
Antimoussant****	1,0 ml
20 Eau du robinet	1000,0 ml

(pH initial 6,8-7,0)

* Peptone, Amber Laboratories, Juneau, Wisconsin, U.S.A.

** Stadex 11, A.E. Staley Co., Decatur, Illinois, U.S.A.

*** N-2-Amine A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, N.J.,

25 U.S.A.

**** P2000, Dow Corning, Midland, Michigan, U.S.A.

<u>MILIEU II</u>	
Ingrédient	Quantité
Glucose	2,5 %
30 Amidon	1,0 %
Peptone de viande soluble*	1,0 %
Mélasse noire	1,0 %
CaCO ₃	0,2 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 %
35 Hydrolysate enzymatique	
de caséine**	0,4 %
Antimoussant***	0,02 %
Eau du robinet	q.s. pour volume

11c



* O.M. Peptone

** N-Z-Amine A

**** Antifoam "A", Dow Corning

On laisse le milieu de production inoculé fermenter dans un réservoir de fermentation de 165 l à une température de 25°C pendant 7 jours. On aère le milieu de fermentation avec de l'air stérile, en maintenant le niveau d'oxygène dissous supérieur à environ 50 % de la saturation en air.

C. Milieu végétatif de troisième stade

- 10 Si l'on effectue la fermentation dans des réservoirs plus grands que ceux utilisés pour la fermentation par 100 litres, il est recommandé d'utiliser une culture végétative de troisième stade pour ensemercer le réservoir plus grand. Un milieu végétatif de troisième stade préféré a la
- 15 composition suivante :

	<u>Ingrédient</u>	<u>Quantité</u>
	Saccharose	25 g
	Mélasse noire	25 g
	Liqueur de macération de maïs	6 g
20	Hydrolysate enzymatique de caséine*	10 g
	Extrait de malt	10 g
	K ₂ HPO ₄	2 g
	Eau du robinet	1000 ml

25 (pH initial 6,1)

* N-Z-Case

D. Séparation du mélange A-42355

- On agite soigneusement le bouillon de fermentation
- 30 entier (4127 litres), obtenu par le procédé décrit dans l'Exemple 1 en utilisant le milieu de production II, avec 4280 litres de méthanol pendant une heure, puis on filtre, en utilisant un adjuvant de filtration (Hyflo Supercel, une terre de diatomées, Johns-Manville Products Corp.). On ajuste le pH
- 35 du filtrat à 4,0 par addition d'HCl 5 N. On extrait le filtrat acidifié deux fois avec des volumes égaux de chloroforme. On réunit les extraits chloroformiques et on les concentre sous vide jusqu'à un volume de 20 litres. On ajoute ce concentré à 200

MC

litres d'éther diéthylique pour faire précipiter le mélange A-42355. On sépare le précipité par filtration et l'on obtient 2775 g du mélange A-42355 sous forme d'une poudre blanc gris.

EXEMPLE 2

5 Séparation du facteur H de A-30912 à partir du mélange A-42355

On dissout 5,0 g du mélange antibiotique A-42355, préparé comme décrit dans l'Exemple 1, dans 35 ml du mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile, on filtre la solution résultante et on l'introduit sur une colonne de verre 10 de 3,7 cm de diamètre intérieur x 42 cm (colonne Michel-Miller) par l'intermédiaire d'une boucle à l'aide d'un système de vannes. La colonne est garnie de résine à phase inversée de gel de silice LP-1/C₁₈ (10-20 microns) dans un mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile comme décrit dans 15 l'Exemple 7. Le solvant se déplace dans la colonne à un débit de 13 ml/minute à environ 8,3 bars, comme décrit dans l'Exemple 3, et l'on recueille une fraction toutes les deux minutes. On contrôle l'élution de l'antibiotique à 280 nm comme décrit dans l'Exemple 3. On réunit les fractions 112-132 avec les fractions 20 106-117 d'une seconde purification similaire. Les fractions réunies sont concentrées sous vide jusqu'à une huile. On dissout l'huile dans un petit volume de t-butanol et on lyophilise pour obtenir 173 mg du facteur H brut de A-30912.

On dissout le facteur H brut de A-30912 (150 mg) dans 25 8 ml d'un mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile ; on filtre la solution résultante et on la réintroduit sur une colonne de verre de 2,0 cm de diamètre intérieur x 32 cm, comme décrit ci-dessus. Le solvant se déplace dans la colonne à un débit de 8 ml/minute à environ 5,5 bars, comme décrit dans 30 l'Exemple 3, et on recueille une fraction toutes les 3 minutes. On contrôle l'élution de l'antibiotique à 280 nm comme décrit dans l'Exemple 3. On réunit les fractions 17 et 18 et on les concentre sous vide pour obtenir une huile. On dissout l'huile dans un petit volume de t-butanol et on lyophilise pour obtenir 35 29 mg du facteur H de A-30912.

EXEMPLE 3

Séparation du facteur H de A-30912 à partir du mélange A-30912

On dissout 6 g du mélange antibiotique A-30912,

préparé comme décrit dans le brevet des E.U.A. N° 4.024.245, dans 33 ml d'un mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile, on le filtre et on l'introduit sur une colonne de verre de 4,7 cm de diamètre intérieur x 45 cm [colonne de chromatographie CLFPCE Michel-Miller, Ace Glass, Inc., Vineland, NJ 08360] par l'intermédiaire d'une boucle à l'aide d'un système à vannes. La colonne est garnie avec la résine à phase inverse de gel de silice LP-1/C₁₈ (10-20 microns), décrite dans l'Exemple 6. On effectue le garnissage dans le système 7:2:1 de méthanol, d'eau et l'acétonitrile par le mode opératoire de garnissage en suspension décrit dans l'Exemple 7. Une pompe F.M.I. avec une conception de piston sans vannes (débit maximal 19,5 ml/minute) est utilisée pour déplacer le solvant dans la colonne à un débit de 14 ml/minute à 7 bars, en recueillant des fractions ayant un volume d'environ 14 ml. L'élution de l'antibiotique est contrôlée à 280 nm, en utilisant un appareil de contrôle UV (ISCO Model UA-5, Instrument Specialist Co., 4700 Superior Ave., Lincoln, Nebraska 68504) équipé d'une unité optique (ISCO Type 6).

On réunit les fractions 109-151 et on les concentre sous vide jusqu'à une huile. On dissout l'huile résultante dans 50 ml de t-butanol. On lyophilise cette solution et l'on obtient 2,927 g du facteur A de A-30912.

On réunit les fractions 152-185 et on les concentre sous vide jusqu'à une huile. On dissout l'huile résultante dans un petit volume de t-butanol. On lyophilise cette solution pour obtenir 46,6 mg du facteur H de A-30912 brut.

EXEMPLE 4

Purification du facteur H de A-30912

On dissout 597 mg du facteur H de A-30912 partiellement purifié, préparé comme décrit dans l'Exemple 3, dans 3 ml du mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile, on filtre et on introduit sur une colonne de verre de 3,7 cm de diamètre intérieur x 35 cm (colonne Michel-Miller) par l'intermédiaire d'une boucle à l'aide d'un système de vannes. La colonne est garnie de résine à phase inversée de gel de silice LP-1/C₁₈ comme décrit dans l'Exemple 3, dans le mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile. On déplace le

solvant dans la colonne à un débit de 7,5 ml/minute (7 bars), en recueillant des fractions toutes les minutes. On contrôle l'antibiotique à 280 nm, en utilisant un appareil de contrôle UV (ISCO Model UA-5) équipé d'une unité optique (ISCO Type 6).

- 5 On réunit les fractions 159-190 et on les ajoute à 100 ml d'eau. On ajuste le pH de la solution à 4,0 avec HCl 1N. On extrait cette solution deux fois avec des volumes égaux de chloroforme. On réunit les deux extraits chloroformiques et on les concentre sous vide jusqu'à obtenir un résidu huileux. On
10 dissout ce résidu dans une solution de 20 ml de t-butanol contenant quelques ml de méthanol. On lyophilise la solution résultante pour obtenir 222 mg du facteur H de A-30912 purifié.

EXEMPLE 5

Préparation de A-30912H tétrahydrogéné

- 15 On dissout dans de l'éthanol le facteur A-30912H, préparé comme décrit dans les Exemples 2 ou 4. On réduit PtO_2 dans l'éthanol absolu pour former Pt que l'on utilise à son tour pour réduire A-30912H par voie catalytique, en utilisant une hydrogénation sous pression positive jusqu'à ce que la réaction
20 soit terminée (environ 2 à 3 heures). On filtre le mélange réactionnel et on le concentre sous vide. On dissout le résidu dans une petite quantité de t-butanol et on le lyophilise pour obtenir A-30912H tétrahydrogéné.

EXEMPLE 6

- 25 Préparation de la résine à phase inversée gel de silice/C₁₈

Etape 1 : Hydrolyse

- On ajoute 1000 g de gel de silice LP-1 (de Quantum Corp., maintenant Whatman) à un mélange de 1650 ml d'acide sulfurique concentré et de 1650 ml d'acide nitrique concentré
30 dans un ballon à fond rond de 5 l et on agite pour obtenir une suspension appropriée. On chauffe le mélange sur un bain de vapeur pendant une nuit (16 heures) avec un réfrigérant à refroidissement d'eau fixé sur le ballon.

- On refroidit le mélange dans un bain de glace et on le
35 filtre soigneusement en utilisant un entonnoir en verre fritté. On lave le gel de silice avec de l'eau désionisée jusqu'à pH neutre. Puis, on lave le gel de silice avec 4 l d'acétone et on le sèche sous vide à 100°C pendant deux jours.

Etape 2 : Première Silylation

Le gel de silice sec de l'Etape 1 est transféré dans un ballon à fond rond et mis en suspension dans 3,5 l de toluène. On chauffe le ballon au bain de vapeur pendant 2 heures pour chasser toute l'eau résiduelle par distillation azéotrope. On ajoute 321 ml d'octadécyltrichlorosilane (Aldrich Chemical Company), et on chauffe le mélange réactionnel à reflux pendant une nuit (16 heures) avec une lente agitation mécanique à 60°C. On prend soin d'éviter que l'agitateur ne soit trop près de la partie inférieure du ballon, pour éviter un broyage des particules de gel de silice.

On laisse le mélange refroidir. On recueille le gel de silice silanisé, on le lave avec 3 l de toluène et 3 l d'acétone, puis on le sèche à l'air pendant une nuit (16-20 heures). On met le gel de silice séché en suspension dans 3,5 l d'un mélange 1:1 d'acétonitrile et d'eau dans un ballon de 5 l, on agite soigneusement à la température ambiante pendant 2 heures, on filtre, on lave avec 3 l d'acétone et on sèche à l'air pendant une nuit.

Etape 3 : Deuxième Silylation

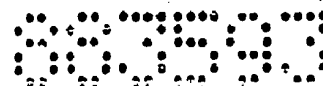
On répète le mode opératoire de la première silylation en utilisant 200 ml d'octadécyltrichlorosilane. On chauffe la suspension à reflux à 60°C pendant 2 heures, tout en agitant soigneusement. On recueille le produit final par filtration, on lave avec 3 l de toluène et 6 l de méthanol, puis on le sèche sous vide à 50°C pendant une nuit (16-20 heures).

EXEMPLE 7

Mode opératoire de garnissage en suspension pour les colonnes Michel-Miller

Renseignements généraux

- A. On peut garnir par ce mode opératoire des colonnes analytiques ou préparatives.
- B. On recommande les garnissages par gel de silice et à phase inversée de gel de silice (par exemple, Quantum LP-1), granulométrie 10-20 microns, LiChoprep RP-8 et RP-18, granulométrie 25-40 microns). Cependant, d'autres gels de silice (par exemple, Shandons ODS Hypersil, granulométrie 5 microns) ainsi que d'autres types de résines ont été utilisés comme garnissage



avec succès à l'aide de ce mode opératoire.

C. En général, une pression inférieure à 14 bars et des débits compris entre 5 et 40 ml/minute sont nécessaires pour cette technique de garnissage en suspension ; ceci dépend du volume et des dimensions de la colonne. Il est important de noter que : la pression de garnissage doit être supérieure à la pression utilisée pendant la séparation réelle de 2 à 3,5 bars ; ceci assure qu'il ne se produit pas de tassement ultérieur de l'adsorbant pendant les séparations. Les colonnes garnies selon ce mode opératoire avec du gel de silice à phase inversée peuvent fonctionner pendant plusieurs années, sans perte d'efficacité.

D. Une diminution soudaine de la pression peut provoquer des craquelures ou des canaux dans le matériau de garnissage, ce qui réduirait de façon importante l'efficacité de la colonne. Il est donc important de laisser la pression descendre lentement jusqu'à zéro chaque fois que l'on arrête la pompe.

E. Volume approximatif des colonnes (Colonnes en verre de Ace, Catégorie No., non garnies) : 5795-04, 12 ml ; 5795-10, 110 ml ; 5795-16, 300 ml ; 5795-24, 635 ml ; et 5796-34, 34 ml.

F. Le temps nécessaire pour garnir une colonne en verre peut varier de quelques minutes à quelques heures, selon la dimension de la colonne et l'expérience de l'opérateur.

Exemple :

1. Relier la colonne de verre à une colonne réservoir par un accouplement (le volume de la colonne réservoir doit être deux fois celui de la colonne). Placer les deux colonnes verticalement avec la colonne réservoir au-dessus.

2. Peser le matériau de garnissage (100 g pour 200 ml de colonne).

3. Ajouter 5 volumes de solvant au matériau de garnissage ; utiliser un mélange de 70-80 % de méthanol et de 20-30 % d'eau.

4. Bien agiter jusqu'à ce que toutes les particules soient mouillées, laisser reposer pendant une nuit ou plus longtemps pour assurer une imprégnation complète des particules par le solvant. Décanter la liqueur surnageante.

5. Délayer la résine avec suffisamment de solvant pour remplir la colonne réservoir. Verser rapidement dans le réservoir.

NB : La colonne doit être préréplie avec le même solvant et la colonne réservoir doit être partiellement remplie du solvant avant de verser la suspension. L'utilisation de volumes de suspension plus grands peut également donner de bons résultats ;
5 cependant, ceci nécessite (a) un réservoir plus grand ou (b) plusieurs remplissages du réservoir pendant l'opération de garnissage.

6. Fermer le réservoir avec le bouchon de Teflon en-dessous de la colonne (voir la Figure 1 du brevet des E.U.A. N° 4.131.547,
10 bouchon N° 3) ; relier à la pompe ; et commencer immédiatement le pompage du solvant dans les dispositifs au débit maximum si l'on utilise une pompe Ace Cat. N° 13625-25, ou un système de distribution de solvant similaire (20 ml/minute).

7. Continuer jusqu'à ce que la colonne soit complètement
15 remplie de l'adsorbant. La pression ne doit pas dépasser la tolérance maximale de la colonne pendant cette opération (14 bars pour les colonnes importantes et 21 bars pour les colonnes analytiques). Dans la plupart des cas, des pressions inférieures à 14 bars seront suffisantes.

20 8. Si la pression dépassait les valeurs maximales, réduire le débit et la pression diminuera.

9. Après remplissage de la colonne par l'adsorbant, arrêter la pompe ; laisser la pression tomber à zéro ; débrancher le réservoir ; remplacer le réservoir par une précolonne ; remplir
25 la précolonne de solvant et d'une petite quantité d'adsorbant, et pomper à la pression maximale jusqu'à ce que la colonne soit complètement garnie. Pour une information supplémentaire, voir le mode opératoire général.

NB : Toujours laisser la pression descendre lentement après arrêt
30 de la pompe ; ceci empêchera la formation de toutes craquelures ou canaux préférentiels dans le matériau de garnissage.

10. Supprimer la pression et débrancher soigneusement la précolonne. Avec une petite spatule, enlever quelques millimètres (2-4) de garnissage au sommet de la colonne ; placer 1 ou 2

35 filtres au sommet de la colonne ; appuyer doucement jusqu'au sommet du matériau de garnissage, et placer un bouchon de Teflon au sommet de la colonne jusqu'à confirmation de l'étanchéité. Relier la colonne à la pompe, introduire la pression (généralement

moins de 14 bars) et observer par la paroi de verre au sommet de la colonne si la résine se tasse davantage. Si le matériau de garnissage doit continuer à se déposer (ceci peut être le cas avec les colonnes de dimensions importantes), un certain espace mort apparaîtra ou bien, il se formera des canaux préférentiels et l'étape 9 doit être répétée.

EXEMPLE 8

Préparation du facteur H de A-30912 à partir du facteur A de A-30912

10 On prépare le facteur H de A-30912 à partir du facteur A de A-30912 en utilisant le mode opératoire suivant :

On dissout 19,6 mg du facteur A de l'antibiotique A-30912 dans 1 ml de diméthylformamide. On ajoute à cette solution 0,06 ml de méthanol acide (3 % de HCl). On agite la solution résultante à la température ambiante pendant une nuit puis on l'évapore à siccité sous vide. On chromatographie le résidu obtenu par CLFPCE comme décrit dans l'Exemple 2, en utilisant du gel de silice à phase inversée (LP-1/C₁₈, préparé comme décrit dans l'Exemple 6) et un mélange 7:2:1 de méthanol, d'eau et d'acétonitrile comme solvant d'élution, et l'on obtient 1,4 mg du facteur H de A-30912 (c'est-à-dire le composé de formule I dans laquelle R est un groupement méthyle et R¹ est un groupement linoléoyle).

EXEMPLE 9

25 On prépare l'antibiotique de type A-30912H de formule I où R est un groupement éthyle et R¹ un groupement linoléoyle par le procédé de l'Exemple 8 mais en utilisant dans la réaction de l'éthanol au lieu du méthanol.

EXEMPLE 10

30 On prépare l'antibiotique de type A-30912H ayant la formule I dans laquelle R est un groupement n-propyle et R¹ un groupement linoléoyle, par le procédé de l'Exemple 8 en utilisant dans la réaction du n-propanol à la place du méthanol.

EXEMPLE 11

35 On prépare l'antibiotique de type A-30912H ayant la formule I dans laquelle R est un groupement isobutyle et R un groupement linoléoyle, par le procédé de l'Exemple 8 mais on utilise dans la réaction de l'isobutanol à la place du méthanol.

Mc

EXEMPLE 12

On prépare et on purifie l'antibiotique de type A-30912H de formule I où R est un groupement n-pentyle et R¹ un groupement linoléoyle, par le procédé de l'Exemple 8 en utilisant 5 dans la réaction du n-pentanol à la place du méthanol.

EXEMPLE 13

On prépare et on purifie l'antibiotique de type A-30912H de formule I où R est un groupement n-hexyle et R¹ un groupement linoléoyle, par le procédé de l'Exemple 8 mais en 10 utilisant dans la réaction du n-hexanol à la place du méthanol.

EXEMPLE 14

On prépare et on purifie un antibiotique de type A-30912H de formule I où R est un groupement éthyle et R¹ un groupement stéaroyle, par le procédé de l'Exemple 8 mais on 15 utilise le facteur A de A-30912 tétrahydrogéné à la place du facteur A de A-30912 et l'on utilise de l'éthanol au lieu de méthanol dans la réaction.

EXEMPLE 15

On prépare l'antibiotique de type A-30912H ayant la 20 formule I où R est un groupement 2-éthyl-1-butyle et R¹ est un groupement linoléoyle, par le procédé de l'Exemple 8 mais en utilisant dans la réaction du 2-éthyl-1-butanol à la place du méthanol.

EXEMPLE 16

On prépare et on purifie l'antibiotique de type 25 A-30912H ayant la formule I où R est un groupement 3-méthyl-1-butyle et R¹ un groupement linoléoyle, par le procédé de l'Exemple 8 mais en utilisant dans la réaction du 3-méthyl-1-butanol à la place du méthanol.

30

EXEMPLE 17

On prépare l'antibiotique de type A-30912 ayant la 35 formule I où R est un groupement n-propyle et R¹ un groupement stéaroyle, par le procédé de l'Exemple 10 mais on utilise le facteur A de A-30912 tétrahydrogéné à la place du facteur A de A-30912.

EXEMPLE 18

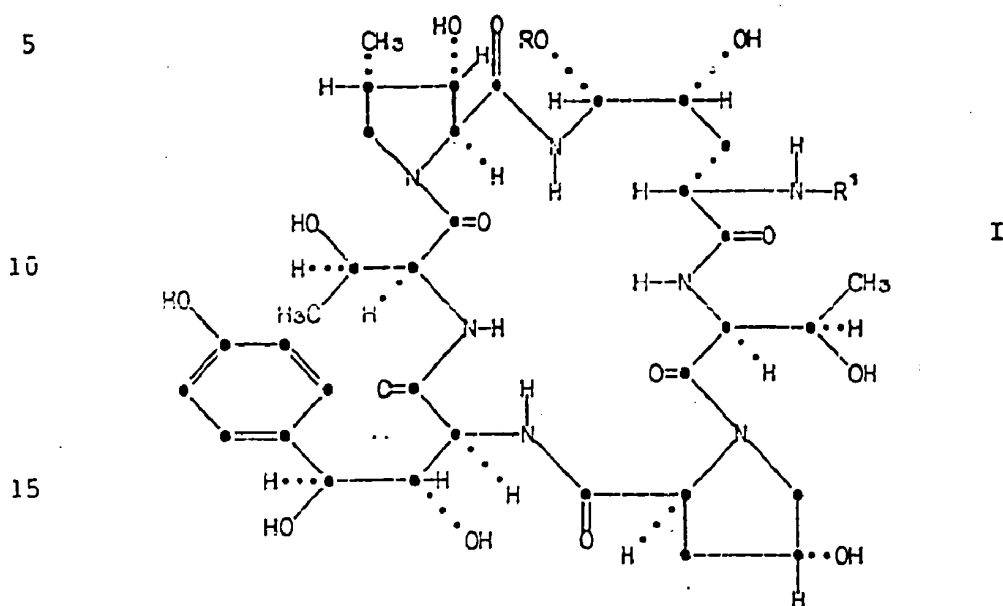
On prépare l'antibiotique de type A-30912 ayant la formule I où R est un groupement isobutyle et R¹ un groupement

812

stéaroyle, par hydrogénation du composé dans lequel R est un groupement isobutyle et R¹ est un groupement linoléoyle (préparé selon l'Exemple 11), selon le procédé de l'Exemple 5.

REVENDICATIONS

1. Antibiotique de type A-30912H, ayant la formule développée :



20 dans laquelle R^1 est un groupement linoléoyle ou stéaroyle et R est un groupement alkyle en C_1-C_6 , pourvu que, quand R est un groupement méthyle, R^1 soit un groupement linoléoyle.

2. Antibiotique de type A-30912H selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^1 est un groupement linoléoyle et R un groupement alkyle en C_1-C_6 .

3. Antibiotique de type A-30912H selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^1 est un groupement linoléoyle et R est un groupement méthyle, c'est-à-dire le facteur H de l'antibiotique A-30912.

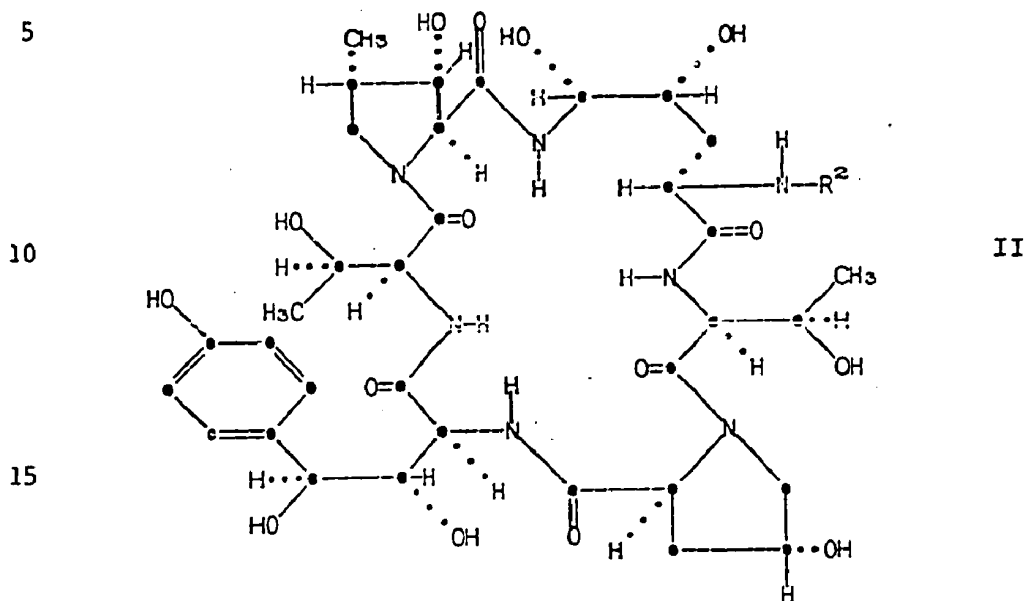
30 4. Antibiotique de type A-30912H selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^1 est un groupement linoléoyle et R un groupement propyle.

5. Antibiotique de type A-30912H selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^1 est un groupement linoléoyle et R un groupement hexyle.

6. Antibiotique de type A-30912H selon la revendication 1, caractérisé en ce que R^1 est un groupement stéaroyle et R est un groupement alkyle en C_2-C_6 .

nc

7. Procédé de préparation d'un antibiotique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on fait réagir un composé de formule II



20 dans laquelle R^2 est un groupement linoléoyle ou stéaroyle

A) quand R^2 est un groupement linoléoyle, avec
1) un alcool de formule ROH où R est tel que défini précédemment ; ou

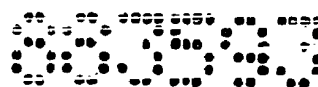
2) un alcool de formule R_3OH où R^3 est un groupement alkyle en C_2-C_6 ;

25 B) quand R^2 est un groupement stéaroyle, avec un alcool de formule R^3OH .

dans un solvant inerte polaire ou dans un excès de l'alcool réactif, à une température de $0^\circ C$ à $70^\circ C$ dans des conditions
30 acides ; et, quand on fait réagir l'alcool R^3OH avec un composé de formule III où R^2 est un groupement linoléoyle, on réduit éventuellement le groupement linoléoyle du composé résultant pour obtenir un groupement stéaroyle.

8. Procédé selon la revendication 7 pour préparer
35 l'antibiotique de type A-30912H de formule I où R^1 est un groupement linoléoyle et R un groupement méthyle, c'est-à-dire le facteur H de l'antibiotique A-30912, caractérisé en ce qu'on fait réagir le facteur A de A-30912, dissous dans du diméthyl-

Me



formamide, avec du méthanol acide (HCl) à la température ambiante pendant une nuit en agitant, puis en évaporant à siccité et en purifiant par chromatographie sous pression élevée.

9. Procédé selon la revendication 7 pour préparer un
5 antibiotique de type A-30912H de formule I où R^1 est un groupement linoléoyle et R^3 un groupement propyle, qui consiste à faire réagir le facteur A de A-30912, dissous dans le diméthylformamide, avec du propanol acide (HCl) à la température ambiante pendant une nuit en agitant, puis à
10 évaporer à siccité et à purifier par chromatographie sous pression élevée.

10. Procédé selon la revendication 7, pour préparer un antibiotique de type A-30912H de formule I où R^1 est un groupement linoléoyle et R un groupement hexyle, qui consiste
15 à faire réagir le facteur A de A-30912, dissous dans le diméthylformamide, avec l'hexanol acide (HCl) à la température ambiante pendant une nuit en agitant, puis à évaporer à siccité et à purifier par chromatographie sous pression élevée.

20 11. Procédé selon la revendication 7, pour préparer un antibiotique de type A-30912H de formule I où R^1 est un groupement stéaroyle et R un groupement alkyle en C_2-C_6 , qui consiste à hydrogéner un antibiotique de type A-30912H de formule I dans laquelle R^1 est un groupement linoléoyle et R est
25 tel que défini précédemment.

12. Composition pharmaceutique qui contient comme ingrédient actif un antibiotique de type A-30912H selon la revendication 1, associé à un support approprié pharmaceutiquement acceptable.

30 13. Antibiotique de type A-30912H qui a la formule développée I telle que décrite dans la revendication 1, utilisé comme agent antifongique pour le traitement d'infections fongiques chez les mammifères par administration d'une quantité efficace de ce composé.

35 14. Antibiotique de type A-30912H qui a la formule développée I telle que décrite dans la revendication 1, essentiellement tel que décrit ici.

ne

883593

36

15. Procédé selon la revendication 7 pour préparer un antibiotique de type A-30912H de formule I selon la revendication 1, essentiellement tel que décrit dans l'un quelconque des Exemples 8 à 18.

5 16. Procédé selon la revendication 7 pour préparer un antibiotique de type A-30912H de formule I selon la revendication 1, essentiellement tel que décrit ici.

ORIGINAL en TRENTÉ-SEPT
PAGES, comportant zéro
mot nul et zéro mot
rajouté.

Par procuration de la Société dite :
ELI LILLY AND COMPANY,
la Société LANGNER PARRY
C/O M. Frank Seifert
77 Frans De Ceusterlei
SCHOTEN 2120 BELGIQUE.

Le 20 mai 1980
H. Courme

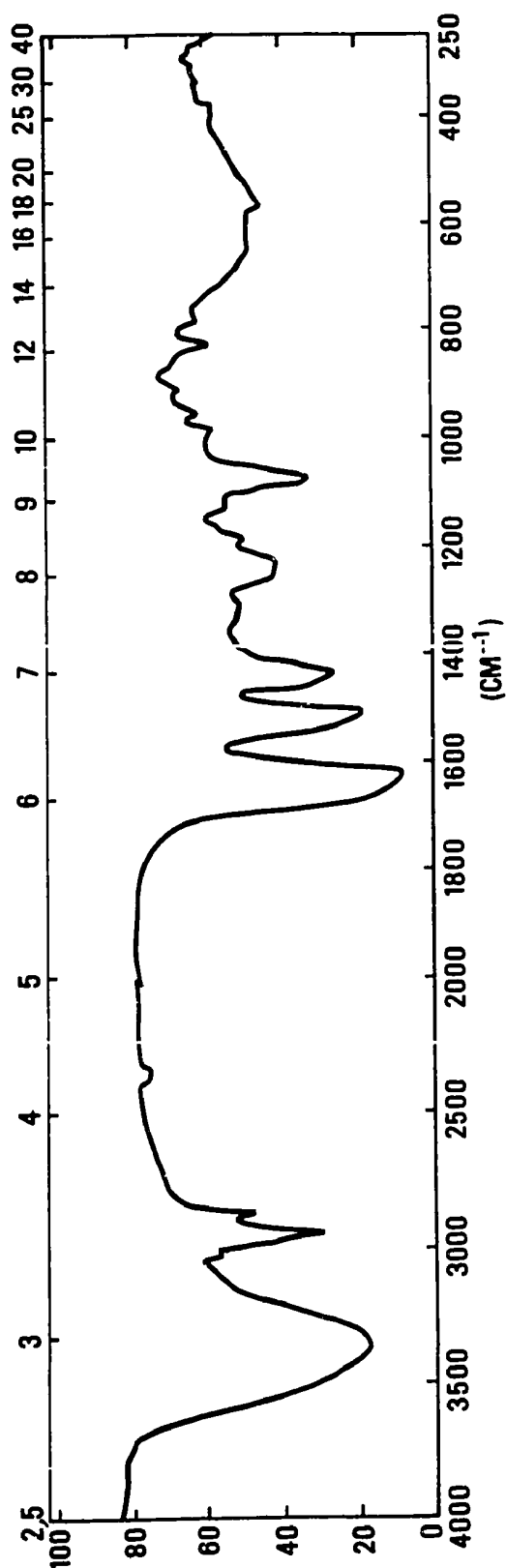


FIG. 1

ORIGINAL

Par procuration de la Société dite :
ELI LILLY AND COMPANY,
la Société LANGNER PARRY.

le 30 mai 1980 V. Courmeau

000000
91 11/11

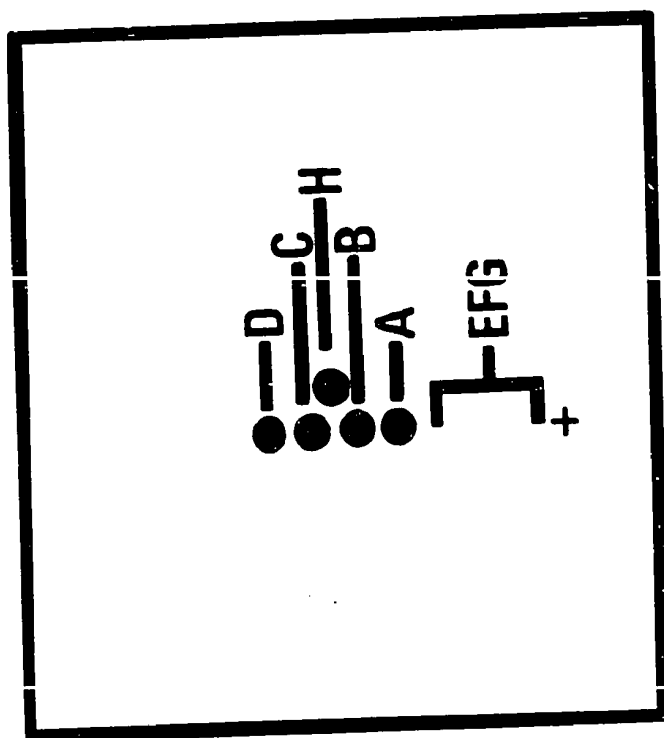


FIG. 2

Par procuration de la Société dite :
ELI LILLY AND COMPANY,
la Société LANGNER PARRY.

le 30 mai 1980 M. Commanche